

## 당과 후기당화합물에 의한 사구체 상피세포 ZO-1 발현의 변화

충북대학교 의과대학 소아과학교실, 의학연구소\*

하태선 · 이진석 · 이해수\* · 윤옥자\*

= Abstract =

### Effects of High Glucose and Advanced Glycosylation Endproducts (AGE) on ZO-1 Expression in cultured Glomerular Epithelial Cells (GEPc)

Tae-Sun Ha, M.D., Jin-Seok Lee, M.D., Hae-Soo Lee, B.S.\* and Ok-Ja Yoon, B.S.\*

*Department of Pediatrics, Medical Research Institute\*  
Chungbuk National University Hospital, Cheongju, Chungbuk, Korea*

**Purpose :** Regardless of the underlying diseases, the proteinuric condition demonstrates ultrastructural changes in podocytes with retraction and effacement of the highly specialized interdigitating foot processes. We examined the molecular basis for this alteration of the podocyte phenotypes, including quantitative and distributional changes of ZO-1 protein as a candidate contributing to the pathogenic changes in the barrier to protein filtration.

**Methods :** To investigate whether high glucose and advanced glycosylation endproduct(AGE) induce podocyte cytoskeletal changes, we cultured rat GEPc under 1) normal glucose(5 mM, =control) or 2) high glucose(30 mM) or 3) AGE-added or 4) high glucose plus AGE-added conditions. The distribution of ZO-1 was observed by confocal microscope and the change of ZO-1 expression was measured by Western blotting and RT-PCR.

**Results :** By confocal microscopy, we observed that ZO-1 moves from peripheral cytoplasm to inner actin filaments complexes in both AGE-added and high glucose condition. In Western blotting, high glucose or AGE-added condition decreased the ZO-1 protein expression by 11.1%( $P>0.05$ ) and 2.3%( $P>0.05$ ), respectively compared to the normal glucose condition. High glucose plus AGE-added condition further decreased ZO-1 protein expression to statistically significant level(12%,  $P<0.05$ ). No significant change was seen in the osmotic control. In RT-PCR, high glucose plus AGE-added condition significantly decreased the expression of ZO-1 mRNA by 12% compared to normal glucose condition.

**Conclusion :** We suggest that both high glucose and AGE-added condition induce the cytoplasmic translocation and suppresses the production of ZO-1 at transcriptional level and these changes may explain the functional changes of podocytes in diabetic conditions. (J

**Korean Soc Pediatr Nephrol 2004;8:138-148)**

**Key Words :** Diabetic nephropathy, Advanced glycosylation endproducts, ZO-1, Glomerular epithelial cells, Podocyte

접수 : 2004년 9월 22일, 승인 : 2004년 10월 20일

이 연구는 2003년 한국과학재단 특정기초연구사업 (KOSEF, R01-2002-000-00251-0)의 보조로 수행되었음.

책임저자 : 하태선, 충북 청주시 흥덕구 개신동 62 충북대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 043)269-6374 Fax : 043)264-6620 E-mail : tsha@chungbuk.ac.kr

서 론

당뇨병성 신병증은 당뇨병 환자 중 20-30% 가량에서 발생하는데, 임상적으로는 단백뇨와 점진적인 신기능 부전을 보이며 병리학적으로는 사구체 기저막의 비후 및 세포 외 기질의 증가와 혈관간세포의 비후를 보인다[1]. 특히, 당뇨병성 신병증에서 단백뇨의 발생은 사구체의 변화와 관련 있는데, 사구체 기저막의 비대, 사구체 상피세포(glomerular epithelial cells, 이하 GEPc라 함) 또는 족세포(podocyte)의 족돌기(foot process)의 확장, 탈락 또는 소실 등의 형태학적 이상을 보이고, non-proteoglycan 성분의 증가로 인한 사구체 여과구조의 변화에 따른 크기장벽의 손상과 proteoglycan과 같은 음전하 성분 감소에 의한 전하장벽기능의 감소에 의해 단백뇨가 발생하는 것으로 설명한다[2-4]. 당뇨병성 신병증의 이러한 소견은 고혈당이나 이차적인 당화합단백 또는 비가역적 산물인 후기 당화합 최종생성물(advanced glycosylation endproducts, 이하 AGE라 함)에 의해 유발된다[5, 6].

Zonula occludens-1(ZO-1)은 사구체 족세포 사이에서 사구체 투과단위의 중요한 구성단위인 세극막(slit diaphragm)에 분포하는 폐쇄소대

(tight junction) 로서 일종의 변형된 접착소대(adherens junction) 단백질이다[7]. ZO-1은 세극막과 세포골격(cytoskeleton) 성분인 actin을 연결시키며[8, 9], 세극막의 다른 단백질들과 상호작용하면서 사구체 투과에 중요한 역할을 한다[10, 11](Fig. 1).

ZO-1의 병리적인 환경에서의 사구체 내 변화를 살펴보면, Smeets 등[12]은 단백뇨 동물 모델인 Thy-1.1 transgenic mice에서 면역형광검사를 통해 ZO-1의 발현 양상이 크게 변화하지 않았다고 하였으나, Kawachi 등[13]은 백서에게 MAb 5-1-6 항체를 주입했을 때 5일 뒤 단백뇨 발생과 함께 ZO-1 발현이 현저하게 감소하였다고 보고하였다. 이와 유사하게 Liu 등[14]도 백서에게 항 Neph-1-nephrin 항체를 주입하여 사구체 투과에 중요한 Neph1-nephrin의 상호작용을 억제시켰을 때 족돌기는 보존된 상태에서 단백뇨를 보이면서 ZO-1의 발현이 현저하게 감소함을 관찰하였다. Macconi 등[10]도 자연적 단백뇨 발생모델인 MWF rat에서 사구체 투과성이나 족돌기의 미세구조의 변화 없이 단백뇨가 발생하였으나, 이는 ZO-1 단백질의 양적 변화보다는 세포질 내에서 불연속적으로 발생하는 ZO-1의 분포변화와 관련이 있다고 하였다. 반면, 신질환 환자 조직에서는, Bains 등[15]은 미세변화형 또는 조기 만성신병증을 포함하는 신증후군 환자의 사구체에서 ZO-1의 양적 변화를 발견할 수 없었고, Ruotsalainen 등[16]은 Fin-major/Fin-major 유전자형을 갖는 태아의 *NPHS1* 신장에서 세극막의 소실은 볼 수 있어도 ZO-1의 발현에는 변화가 없다고 하였다. 이와 같이 단백뇨 질환의 종류에 따라 ZO-1의 발현은 다른 양상을 보인다. 그러나 현재까지 당뇨병성 신병증에서의 ZO-1의 역할에 대한 연구는 드문 실정이다[17]. 이에 본 연구자들은 당뇨병성 신병증을 포함한 단백뇨 질환에서 자주 관찰할 수 있는 GEPc의 형태학적 이상에 있어서 ZO-1의 변화를 생체 외 배양실험을 통하여 알아보려고 하였다.

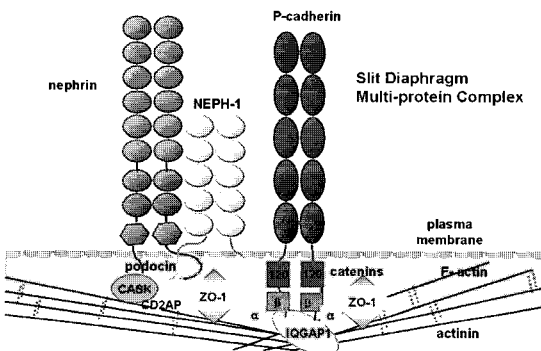


Fig. 1. ZO-1 protein is concentrated in slit diaphragms and has been demonstrated to interact with the components of cell-cell junctions ( $\alpha$ -catenin) and cytoskeletal networks(F-actin).

## 재료 및 방법

### 1. 백서 사구체 상피세포의 배양

Kreisberg가 성상을 확인하고 공여한 백서의 GEpC를 배양하여 실험에 이용하였다[18, 19]. 유지 배양액으로는 10% fetal bovine serum (FBS), 1 M Hepes, 0.2 M L-glutamine, 0.01 U/mL insulin 그리고 항생제를 혼합한 RPMI 1640 배양액(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)을 사용하였고 배경을 줄이기 위해 각각의 실험 전에 FBS 0.5%만을 첨가하였다. 배양액 교환은 3일에 한번씩 하였고 계대배양은 0.05% trypsin으로 이탈시킨 후 위의 배양액으로 다시 배양하였다[19-21].

### 2. AGE와 당이 포함된 배양액 투여

흔히 당뇨병성 신병증의 배양실험 모델로서 주로 이용하는 당뇨병 환경으로는 5 mM(=90 mg/dL) 정도의 생리적 농도의 당(포도당)과 30 mM(=540 mg/dL) 전후의 병리적 고농도의 당을 배양액에 혼합하여 흔히 비교한다. 따라서 전술한 유지배양액에 5 mM의 당에 인슐린을 생리적 농도인 0.66 unit/ml를 포함시킨 배양액과 인슐린을 섞지 않은 30 mM의 당을 배합한 배양액으로 48시간 동안 배양하여 이들 세포를 실험에 이용하였다. 이때 배양액은 4일에 한차례 교환하고 분리 전 배경을 줄이기 위하여 fetal calf serum은 0.5%를 섞고 인슐린은 생리학적 농도의 당환경에서만 0.66 unit/ml를 혼합하였다. 이에 대한 의미는 이전 논문에서 상세히 서술하였다[21]. AGE는 이전에 기술한 방법대로 준비한 것을 이용하였고 동시에 준비한 bovine serum albumin (BSA)를 대조군으로 하여 5 µg/ml의 농도로 배양액에 희석하여 투여하였다[19, 22, 23]. 약하여, 배양액 속 당의 농도를 5 또는 30 mM로, AGE와 BSA를 첨가하고 osmotic control로서 당(포도당) 5 mM에 mannitol 25 mM을 섞은 것을

조합하여 A5, A30, A0sm, B5, B30으로 군을 나누었다[19, 22]. 각 군의 의미는 이전 논문에서 상세히 서술하였다[21].

### 3. 공초점 현미경(confocal microscopy)를 이용한 ZO-1과 F-actin의 분포변화 관찰

세포를 collagen type-I(Upstate Biotechnology, USA)으로 코팅한 glass cover slips에 각각의 조건으로 48시간 배양하고 뽀뽀하게 자라면 phosphate buffer solution(PBS)으로 3번 세척을 해준 후 4% paraformaldehyde를 200 µl씩 실온에서 10분간 처리하여 세포를 고정하고 고정에서 사용된 paraformaldehyde의 aldehyde기를 제거하기 위해 0.02 M glycine이 들어있는 PBS를 이용하여 3번 세척하였다. 그 후 비특이적인 배경을 최소화하기 위하여 10% normal goat serum(GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)을 well 당 200 µl씩 처리하여 37°C에서 30분간 배양한 다음 goat serum을 버리고 monoclonal mouse anti-rat ZO-1(Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA, USA) 항체를 1:50으로 희석하여 well 당 200 µl씩 37°C에서 1시간 배양한 뒤 PBS를 이용하여 10분간 3번씩 shaker에서 세척하였다. FITC-conjugated anti-mouse IgG 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 우선 25 µg/ml로 PBS에 희석하여 37°C에서 40분간 배양하고 0.1% triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 2번 세척한 후 다시 PBS로 2번 10분간 세척하였다. Actin을 염색하기 위해 F-actin phalloidin-TRITC(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 2.5 µg/ml의 농도로 희석한 후 검체 당 200 µl씩 37°C에서 40분간 반응시켰고, 다음 triton X-100이 들어있는 PBS로 10분간 3회 세척하고 다시 PBS로 2회 세척한 후 slide glass 위에 mount media를 적당량 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 관찰하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 관찰은 Fluorescence microscope(TCS SP2

AOBS, Leica, Germany)으로 FITC-conjugated는 emission 496-534 nm, excitation 488 nm의 파장으로, TRITC-conjugated는 emission 555-635 nm, excitation 543 nm의 파장으로 항원의 분포변화를 관찰하였다. 공간적 분석은 핵 주위로 양쪽 세포막을 연결하는 직선 위에 분포한 염색물질을 색깔별로 분리하고 이를 도식화하였다(Leica confocal software v2.5). 각각의 세포크기를 프로그램을 통하여 동일하게 한 후 비교하였다.

#### 4. ZO-1 단백질 측정

플라스틱 배양용기에 48시간 동안 배양한 각 조건의 세포들을 PBS로 2회 세척한 다음 세포분획을 4 M guanidinium-HCl, 2% CHAPS, 단백질효소억제제(100 mM 6-aminohexanoic acid, 10 mM benzamidine HCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용하여 4°C에 24시간동안 반응시킨 뒤 분리하였다. 세포분획의 단백질을 결정화 후 30 µg을 4/12% polyacrylamide gradient gel에 분주하고 전기영동으로 분리시킨 후 3시간 동안 PVDF membrane에 전사시키고 비특이적인 반응을 억제하기 위해 3% skim milk를 포함한 PBS와 반응시켰다. 다음 전술한 일차항체로 실온에서 2시간 동안 반응시키고 TBST(washing buffer)로 5-10분 간격으로 2-3회 세척한 다음, 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated IgG(Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, California, USA)를 60분간 반응시키고 TBST로 세척한 후 LumiGLO chemiluminescent substrate를 이용하여 X-ray film에 노출시켰다. Band density를 densitometry(LabWorks 4.0, UVP, Inc. Upland, CA, USA)로 각각 측정하여 각 조건의 결과를 비교하였다.

#### 5. ZO-1에 대한 RT-PCR

48시간 동안 각 조건에서 배양한 GEPc의

RNA를 분리하기 위해 RNA isolation solution과 chloroform으로 추출 후 isopropanol과 3% sodium acetate, 100% ethanol을 이용하여 침전시킨 다음 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA 5 µg의 농도로 M-MLV reverse transcriptase(Intron, Korea)과 oligo-dT(KDR, Korea), 2.5 mM dNTP(Intron, Korea), 그리고 증류수로 최종 20 µl로 부피를 맞춘 후 37°C에서 20분간 반응 후 90°C에서 효소의 반응을 불활성화시킨 후 합성된 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다. 사용한 백서의 ZO-1 sense의 염기서열은 5'-CGTTCTAGAAGATAGCCTGC-3'이고, antisense의 염기서열은 5'-CTCTTGAGCTGCGAAGACC-3'이었으며 housekeeper로서 백서의 GAPDH sense의 염기서열은 5'-CTCTACCCACGGCAAGTTCAA-3'이고, antisense의 염기서열은 5'-GGATGACCTTGCCCACAGC-3'이었고 Bionics(Korea)에 주문 제작하였다. 10 ×PCR buffer(Intron, Korea), 2.5 mM dNTP(Intron, Korea)과 각각의 특정 primer에 증류수를 더하여 전체 양을 50 µl로 맞춘 후 94°C에서 5분간 가열한 다음 94°C 30초, 각각에 맞는 annealing 온도에서 30초간, 72°C에서 30초간 30 cycles을 시행하였다. 생성물을 1.5% agarose gel을 이용하여 각 시료의 PCR 생성물 15 µl를 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV light 하에서 polaroid film에 감광시키고 densitometry(LabWorks 4.0, UVP, Inc. Upland, CA, USA)로 각각 측정된 후 GAPDH의 값으로 보정하였다.

#### 6. 통계적 분석

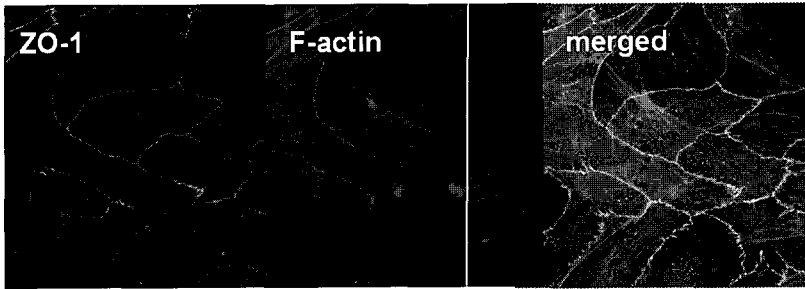
대조군과 함께 각 항목에 대하여 Western 분석은 4회, RT-PCR은 5회 실험한 후 결과를 비모수적 Mann-Whitney U test 방법으로 통계 처리하였으며 P값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성을 두었다.

**결 과**

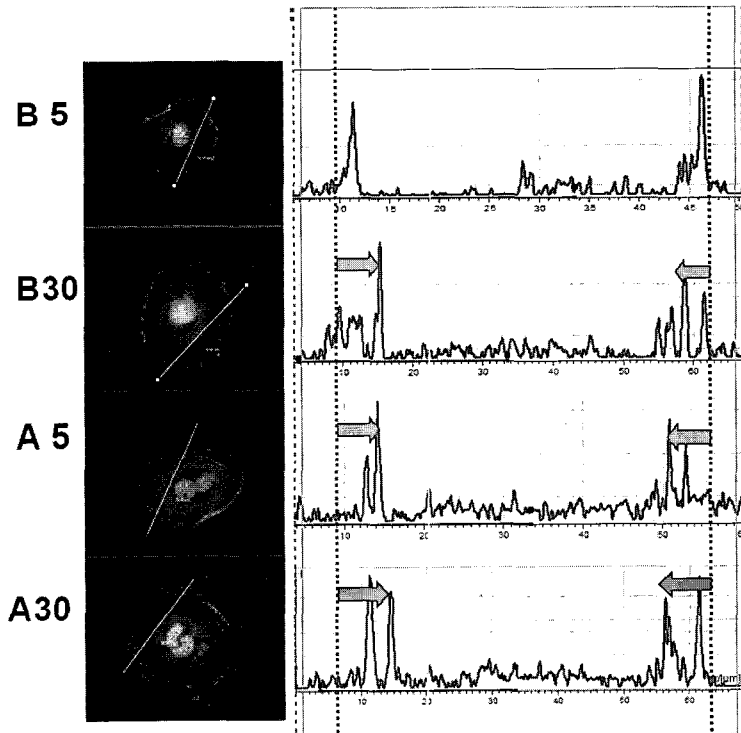
**1. 공초점 현미경을 이용한 ZO-1의 분포**

공초점 현미경으로 관찰한 ZO-1(green dots)는 세포가 뻣뻣하게 자란 경우 세포사이에 선상

으로 분포하여 세포간 교차(junctional) 단백질의 역할을 수행할 것으로 생각된다(Fig. 2). 단독 세포로서 관찰하였을 때, 세포막 내부의 세포질에 분포하나 조건에 따라 위치가 변하는 양상을 볼 수 있다(Fig. 3). 핵의 옆면에 분석면을 정하여 분석하였을 때 정상 생리적인 환경인 B5에서



**Fig. 2.** Confocal microscopy of confluent glomerular epithelial cells with F-actin phalloidin-TRITC(red color) and monoclonal ZO-1 antibody(FITC-conjugated, green dots). Merged view shows that ZO-1 protein is located along the cell-to-cell contact areas.

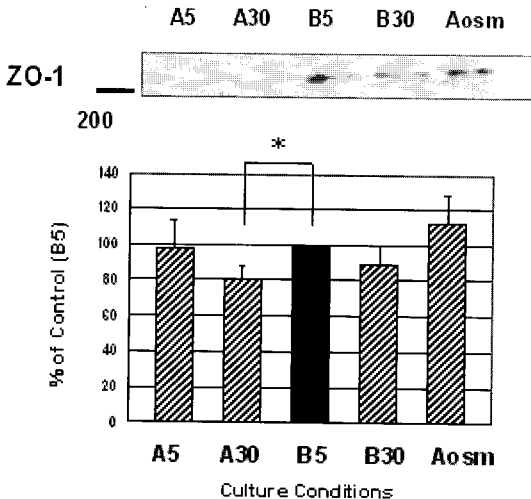


**Fig. 3.** Confocal microscopy with F-actin phalloidin-TRITC(red color) and monoclonal ZO-1 antibody(FITC-conjugated, green dots). Merged views and distributional curves show that ZO-1 dots are moving inside from B5 to A30.

B30, A5를 거쳐 가장 병적인 A30 환경으로 진행할수록 ZO-1는 세포질의 바깥에서 안쪽으로 이동하는 양상(cytoplasmic translocation)을 보였다(Fig. 3).

## 2. Western 분석을 이용한 ZO-1 성분 측정

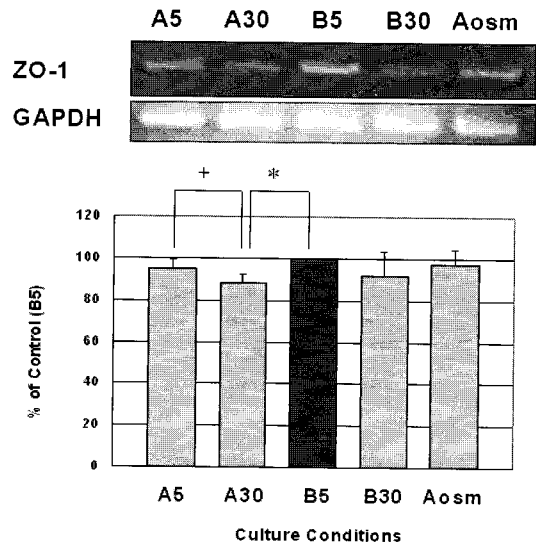
Bands는 205 kD 부위에서 관찰할 수 있었으며 가장 생리적 환경인 B5 결과를 대조군으로 하여 각 군의 ZO-1의 band density를 비교하였을 때 당을 첨가한 B30에서 11.1%, AGE를 첨가한 A5에서는 2.3%가 감소하였으나 유의하지는 않았다. 그러나 당과 AGE를 동시에 첨가한 A30에서는 19.0%로 유의한 감소를 보였다( $P < 0.05$ , Fig. 4). Osmotic control(Aosm)에서도 유의한 변화를 관찰할 수 없었다( $P > 0.05$ , Fig. 4). 따라서 고농도의 당과 AGE에 의해 GEPc의 ZO-1 단백질량은 감소하는 양상을 보였고 이러한 양상은 삼투압 차이 효과가 아닌 당과 AGE에 의한 효과임을 알 수 있었다.



**Fig. 4.** Effects of glucose and AGE on cellular ZO-1 protein levels in cultured glomerular epithelial cells assayed by Western blotting. Density values for ZO-1 protein of representative immunoblots from each group show decreased cellular ZO-1 protein levels in A30 conditions. Control (100%); the value of B5. \* $P < 0.05$  for the value of B5.

## 3. RT-PCR을 통한 ZO-1의 expression 측정

ZO-1에 대한 PCR 생성물을 481 base pairs 에서 확인할 수 있었으며 ZO-1 mRNA의 표현 양을 GAPDH mRNA의 표현양으로 교정한 후 B5의 결과를 대조군으로 하여 각 군의 결과를 비교하였다. RT-PCR에 의한 ZO-1의 band density는 고농도의 당을 첨가한 B30에서 8.2%의 감소와 AGE를 추가한 조건인 A5에서 5.0%의 감소를 보였으나 통계적인 의의는 없었고 ( $P > 0.05$ , Fig. 5), AGE와 고농도의 당을 동시에 추가한 조건인 A30에서 12.0%의 의의 있는 감소를 보였다( $P < 0.05$ , Fig. 5). A30에서의 감소는 A5의 결과와도 유의한 감소를 보였다( $P < 0.05$ , Fig. 5). 그러나 osmotic control(Aosm)에서는 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. 즉, 고농도의 당과 AGE은 유전자 수준에서 GEPc의 ZO-1의 생성을 억제시키고 ZO-1를 세포질 내로 이동시



**Fig. 5.** Effects of glucose and AGE on the mRNA expression of ZO-1 in cultured glomerular epithelial cells assayed by RT-PCR. Density values for ZO-1 mRNA of representative gels from each group show decreased RT-PCR products of ZO-1 in A5 and A30 groups. Control(100%); the value of B5. \* $P < 0.05$  for the value of B5, + $P < 0.05$  for the value of A5

키는 분포의 변화를 초래하였다.

## 고 찰

GEpC은 사구체 기저막의 외측면을 감싸면서 단백질 소실의 최종 장벽을 형성하기 때문에 손상되면 단백뇨가 발생한다[24]. 단백뇨를 동반하는 질환에서 자주 관찰할 수 있는 족세포 족돌기의 확장, 탈락과 소실 등의 형태학적 변화의 기전은 족세포 간의 세극막의 변화, 족세포와 사구체 기저막간의 변화, 음이온을 띄고 있는 족세포의 꼭대기막 영역(apical membrane domain)의 변화, 족세포의 세포골격을 담당하는 actin과 이와 연관된 단백질의 변화 또는 족세포의 분화에 관여하는 조절물질의 이상으로 설명한다[8, 24, 25]. 이 중 세극막은 서로 다른 족세포로부터 나온 인접한 족돌기들 사이를 연결하는 유일한 구조로서, 간상체(rod-like units)들이 지퍼형태의 선상구조를 이루고 있다[7, 26]. 전형적 상피세포는 분자량이 큰 물질들이 세포간 공간을 통과하지 못하게 하는 폐쇄소대나 zonulae occludentes와 복합체를 이루고 있으므로 세극막도 폐쇄소대의 일종이라고도 여겨졌으나, 사구체의 족세포는 이러한 소대나 세포간 공간 대신 서로 맞물려 있는 족돌기로 구성된 세극막을 가지고 있으면서 분자들의 통과를 용이하게 하므로 전형적 폐쇄소대라기 보다는 변형된 접착소대로 여겨진다[7, 27].

최근 몇 년 사이의 연구에서 세극막 부위에 존재하는 여러 가지 단백질로서 nephrin, ZO-1, P-cadherin, FAT, podocin, catenin, CD2AP 등이 밝혀졌고(Fig. 1), 이러한 분자들의 변화가 사구체 질환에서 단백뇨의 병인일 수 있다고 추측되고 있다[8, 24, 25]. 이 중에 nephrin은 세극막을 구성하는 단백질 중 최초로 보고된 단백질로[28], 사구체 여과기능을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있으며[25, 29], 핀란드형 선천성 신증후군 환자에서 돌연변이를 보이는

*NPHS1* 유전자의 산물이다[29, 30].

1986년 Stevenson 등[31]은 ZO-1이 상피세포의 폐쇄소대에 존재한다는 사실을 처음으로 밝혔고, Schnabel 등[27]은 ZO-1이 사구체 세극막에 존재한다는 것을 증명하였으며, Kurihara 등[32]은 ZO-1의 두 가지 isoform이 존재한다는 것을 밝혔다. ZO-1은 membrane-associated guanylate kinase(MAGUK) family에 속하는 분자량 205-225 kD의 단백질로[9, 31, 32], 폐쇄소대 세포질로 삽입되는 부위에 존재한다[25, 27]. ZO-1은 인간 사구체의 발달과정 중 비교적 이른 시기인 S-shaped body stage에 발현되어 capillary loop stage가 되면 족세포의 꼭대기부분(apical portion)에서 측면으로 이동하게 되고, 폐쇄소대 부착과 관련된 ZO-1은 세극막의 세포질을 따라 집결하게 된다[16, 27, 33]. ZO-1은 다른 단백질과 밀접한 연결을 지니고 있는데, ZO-1의 N-terminal은  $\alpha$ -catenin, C-terminal은 actin filament와 직접적으로 상호작용하며, cadherin/catenin 복합체와 actin 세포골격 사이의 교차결합인자(cross-linker)로 작용한다[9]. 백서 신장의 confocal microscopy 조건에서 ZO-1은 P-cadherin과 같은 부위에 국소화(co-localization)되어 있다[7, 34]. ZO-1은 세포질 쪽에 있는 첫 번째 발판 재료(scaffolding) 단백질로[27, 35], tyrosine phosphorylation을 통해 신호전달에 관여할 뿐만 아니라, 사구체 폐쇄소대 형성 등에 관여하게 되며, 생물학적 기능을 조절받는다[25, 27]. ZO-1의 첫 번째 PDZ 영역은 Neph1 단백질의 카르복시말단과 결합하여 Neph1의 phosphorylation 및 신호전달 과정에 영향을 미친다[24, 35, 36]. 세포핵에서 발견되는 ZO-1은 폐쇄소대 복합체의 조직화(organization) 이외에 세포 성장 및 분화에도 관여한다[37].

병적 환경에서 사구체 ZO-1의 변화를 살펴보면, 사구체 질환 동물 모델에서 Smeets 등[12]은 Thy-1.1 단백을 족세포에 발현토록 한 Thy-1.1 transgenic mice에서 Thy-1.1에 대한 항체투여

에 의해 심한 단백뇨가 발생하였고 죽돌기 감소와 세극막 폭의 감소를 볼 수 있었으나, 면역형광검사상 ZO-1, nephrin, synaptopodin 등의 발현 양상은 크게 변화하지 않았다고 하였다. 그러나 이러한 변화의 관찰은 항체 투입 초기 10분 뒤의 결과로서 이후 장기적인 조직학적 변화에 따른 관찰결과는 없다. 그러나 Kawachi 등[13]은 백서에게 죽세포와 사구체 세극막을 목표로 하는 MAb 5-1-6 항체를 주입했을 때, 단백뇨가 발생하기 전인 1시간 뒤부터 ZO-1의 발현이 서서히 감소되기 시작하여 단백뇨가 최대에 이르는 5일 뒤에는 ZO-1이 거의 발현되지 않음을 보고하였다. 이와 유사하게 Liu 등[14]도 백서에게 항 Neph1-nephrin을 주입하여 사구체 투과에 중요한 Neph-1-nephrin의 상호작용을 억제시켰을 때 죽돌기는 보존된 상태에서 단백뇨를 보이면서 ZO-1의 발현이 현저하게 감소하였는데, 이는 Neph1/nephrin/ZO-1 복합체가 세극막에 존재하며 항체에 의해 Neph1/nephrin 연관성이 붕괴되면 단백뇨가 발생하면서 ZO-1의 표현이 감소하는 것으로 설명하였다. 즉 죽세포 또는 사구체 세극막 성분에 이상을 초래하는 병적인 상태에서 조직학적 변화를 관찰하기 이전이라도 단백뇨 발생과 함께 ZO-1의 감소를 관찰할 수 있다. Macconi 등[10]은 자발적 단백뇨가 발생하는 MWF rats에서 사구체 투과성이나 죽돌기의 미세구조의 변화 없이 자발적 단백뇨가 발생하였으나, 이는 ZO-1 단백질의 양적 변화보다는 세포질 내에서 불연속적으로 발생하는 ZO-1의 분포변화와 관련이 있다고 하였다. Kurihara 등[11]은 정상적으로 세극막의 세포질 표면을 따라 존재하던 ZO-1이 puromycin aminonucleoside에 의해 유발된 신증후군 동물모델에서 기존의 세극막 뿐만 아니라 새로 생긴 occluding-type junctions을 따라서 집합함을 면역전자현미경으로 관찰하였다. 이 결과들은 양적 변화까지는 관찰하지 않았으나 죽돌기의 미세구조변화가 없이도 단백뇨가 있는 상태에서 ZO-1 분포의 재분배가 일어남

을 의미한다. 이와 같이 실험적인 사구체 병리적 환경에서 ZO-1은 발현이 감소 혹은 분포의 재분배 등이 일어남을 알 수 있고 이러한 결과는 본 연구에서 보이는 실험적 당뇨병 환경에서의 ZO-1 발현의 감소와 재분포와의 관련성을 추론할 수 있다.

반면, 신질환 환자 조직에 대해 Bains 등[15]은 미세변화형 또는 조기 막성 신병증을 포함하는 신증후군 환자의 사구체에서 ZO-1의 양적 변화를 발견할 수 없었다고 하였고, Ruotsalainen 등[16]은 Fin-major/Fin-major 유전자형을 갖는 태아의 *NPHS1* 신장에서 세극막의 소실은 볼 수 있어도 ZO-1의 발현은 변화가 없었는데, 이는 피니쉬형 선천성 신증후군에서 보이는 심한 단백뇨의 발생이 ZO-1과 직접적인 관련은 없고 ZO-1의 발현에도 영향을 미치지 않는다고 하였다. 아직 당뇨병성 신병증 환자의 신조직에서 ZO-1에 대한 보고는 없으나 전술한 환자조직에서 ZO-1의 분포변화는 관찰하지 않았으며, 양의 변화를 관찰할 수 없다는 결과는 조직채취시기, 방법의 차이, 실제 검사자체의 문제 등에 대한 추후 확인이 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 사용한 비가역적인 AGE는 세포 표면의 수용체와 반응하여 광범위한 신손상과 관련된 일련의 세포작용을 일으킨다[38, 39]. 본 연구에서는 AGE와 고농도 포도당으로 자극한 당뇨병성 신병증 환경에서의 GEpC에서 ZO-1의 분포는 *in vivo* 비당뇨병성 신증에서의 보고와 유사하게, 그리고 본 연구자가 보고하였던  $\alpha$ -actinin-4의 결과[21]와 유사하게 세포질의 바깥에서 안쪽으로 이동하는 양상(cytoplasmic translocation)을 보였다. 그러나, Western blot 및 RT-PCR 검사에서 ZO-1의 mRNA의 표현양상의 감소와 함께 단백질수준에서 생성이 감소하였는데, 이는 ZO-1 mRNA와 단백질의 발현이 고농도 포도당으로 자극한 죽세포 및 실험적 당뇨병성 신병증의 사구체에서 증가하였다는 이전의 보고와는 상반된다 [17]. 이러한 결과의 차이는 실험대상 세포가 다



름으로 인한 세극막의 다른 단백질이나 actin 세포 골격의 변화의 차이, Kim 등[17]의 연구는 7일간 노출시킨 데 반해 본 연구는 2일간 노출시킨 배양시간의 차이와 이에 대한 보상기전 활성화 유무 등에 의한 것으로 사료된다. 또한, Kim 등 [17]의 연구는 *in vivo* 연구에서도 유사한 결과를 증명하였으므로 향후 본 연구자들은 *in vivo* 에서 당뇨병 유발 기간의 차이에 의한 ZO-1의 변화도 관찰하고자 한다.

결론적으로, AGE와 고농도의 당에 의한 GEpC의 ZO-1 단백질의 분포변화와 양의 감소로서 장기간 당뇨환경에서 족돌기의 기능적 변화를 추측할 수 있을 것이며 추후 AGE에 의한 ZO-1의 변화 기전에 대한 연구 및 *in vivo* 당뇨병성 신병증에서 시기별 ZO-1의 양과 분포변화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 한 글 요약

**목 적 :** 단백질뇨 질환에서 볼 수 있는 사구체 상피세포(glomerular epithelial cells, GEpC) 족돌기(foot process)의 병리학적 변화에 있어서 GEpC사이의 세극막(slit diaphragm)과 세포골격을 연결하는 ZO-1 단백질의 당뇨조건에 따른 변화를 알아보고자 하였다.

**방 법 :** 백서 GEpC를 배양하고 고농도의 당과 후기당화합물(advanced glycosylation endproducts, AGE)를 적용하여 당뇨병 환경에 가까운 조건을 설정한 후, ZO-1 단백질양은 Western 분석으로, 분포 변화는 공초점 현미경으로, 유전자 표현의 변화는 RT-PCR로 관찰하였다. 실험군은 당의 농도를 5 또는 30 mM로, AGE와 BSA를 첨가하고 osmotic control로서 당 5 mM에 mannitol 25 mM을 섞은 것을 조합하여 A5, A30, B5, B30, Aosm로 하였다.

**결 과 :** 공초점 현미경 상 ZO-1은 정상적인 환경인 B5에서 B30, A5, 가장 병적인 A30 환경으로 진행할수록 세포질의 바깥에서 안쪽으로 이

동하는 양상을 보였다. ZO-1 단백질양은 B5 결과를 대조군으로 비교하여 당을 첨가한 B30에서 11.1%, AGE를 추가한 조건인 A5에서 2.3% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었고, 당과 AGE가 동시에 첨가된 A30에서는 19.0%의 유의한 감소를 보였다. mRNA의 발현도 A30에서만 12.0%의 유의 있는 감소를 보였다. 이러한 단백질과 mRNA의 감소 소견은 osmotic control (Aosm)에서는 관찰할 수 없었다.

**결 론 :** 고농도의 당과 AGE에 의한 GEpC의 ZO-1의 분포 변화와 유전자 수준에서의 억제로 단백질의 생성 감소를 초래함으로써, 장기간 당뇨 환경에서 족돌기의 형태학적 변화를 설명할 수 있으며, 추후 이의 변화 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al. Pathogenetic mechanisms of glomerular injury, in Harrison's Internal Medicine, 14th ed. New York, McGraw-Hill Companies, 1998;1534-6.
- 2) Scandling J, Myers B. Glomerular size-selectivity and micro-albuminuria in early diabetic glomerular disease. *Kidney Int* 1992; 41:840-6.
- 3) Westberg NG, Michael AF. Human glomerular basement membrane chemical composition in diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 1973;194:39-47.
- 4) Ha TS. Researches on the pathophysiology of proteinuria in diabetic nephropathy. *Korean J Pediatr* 1998;41(Suppl 1):S69-S74.
- 5) Sharma K, Ziyadeh FN. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 1997;17:80-92.
- 6) Vlassara H. Protein glycation in the kidney: Role in diabetes and aging. *Kidney Int* 1996;49:1795-804.
- 7) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P.

- The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1-8.
- 8) Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3005-15.
  - 9) Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 1997;138:181-92.
  - 10) Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:477-89.
  - 11) Kurihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farquhar MG. The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am J Pathol* 1992;141:805-16.
  - 12) Smeets B, Dijkman HB, te Loeke NA, van Son JP, Steenberg EJ, Assmann KJ, et al. Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2524-33.
  - 13) Kawachi H, Kurihara H, Topham PS, Brown D, Shia MA, Orikasa M, et al. Slit diaphragm-reactive nephritogenic MA5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 1997;273:F984-F993.
  - 14) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003;112:209-21.
  - 15) Bains R, Furness PN, Critchley DR. A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states. *J Pathol* 1997;183:272-80.
  - 16) 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.
  - 17) Kim BS, Xu ZG, Park HC, Kang SW, Choi KH, Ha SK, et al. Change of ZO-1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured mouse podocyte under high glucose conditions and the effect of angiotensin II type I receptor blocker. *Korean J Nephrol* 2003;22:632-44.
  - 18) Kreisberg JL, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1978;14:21-30.
  - 19) Ha TS, Kim HS, Kasinath BS. Effects of high glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) on the heparan sulfate proteoglycan(HSPG) produced by cultured rat glomerular epithelial cells(GEC). *Korean J Nephrol* 2000;19:22-30.
  - 20) Song CJ, Ha TS, Lee HS, Yoon OJ. Effects of angiotensin II on glomerular epithelial cells permeability model; role of oxidative stress. *Korean J Nephrol* 2004;23:364-72.
  - 21) Ha TS. Effects of high glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) on the  $\alpha$ -actinin-4 expressed by glomerular epithelial cells(GEpC). *Korean J Nephrol* 2004;23:5:694-702.
  - 22) Ha TS, Duraisamy S, Faulkner JL, Kasinath BS. Regulation of glomerular endothelial cell proteoglycans by glucose. *J Korean Med Sci* 2004;19:245-52.
  - 23) Ha TS, Kim HS. Effects of advanced glycation endproducts on rat glomerular epithelial cells: Roles of reactive oxygen species. *Korean J Nephrol* 2003;22:285-93.
  - 24) Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003;7:255-9.
  - 25) Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19:130-7.
  - 26) Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974;60: 423-33.
  - 27) Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG.

- The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990;111:1255-63.
- 28) Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2440-5.
- 29) Dreyer SD, Morello R, German MS, Zabel B, Winterpacht A, Lunstrum GP, et al. LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:1067-74.
- 30) Tryggvason K, Wartiovaara J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:543-9.
- 31) Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction(zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-66.
- 32) 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* 1992;89:7075-9.
- 33) Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
- 34) Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1993;121:491-502.
- 35) Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1382-91.
- 36) Huber TB, Schmidts M, Gerke P, Schermer B, Zahn A, Hartleben B, et al. The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* 2003;278:13417-21.
- 37) Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1206-37.
- 38) Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994;70:138-51.
- 39) Vlassara H. Protein glycation in the kidney. Role in diabetes and aging. *Kidney Int* 1996;49:1795-804.