

# Puromycin aminonucleoside의 사구체 상피세포에 대한 영향

포천중문의대 분당차병원 소아청소년과, 충북대학교 의과대학 소아과학교실\*

이 준 호 · 하 태 선\*

## Effects of puromycin aminonucleoside on the cytoskeletal changes of glomerular epithelial cells

Jun Ho Lee, M.D. and Tae Sun Ha, M.D.\*

Department of Pediatrics, Pochon CHA University, College of Medicine  
Department of Pediatrics\*, Chungbuk National University, College of Medicine

**Purpose :** This study was designed to clarify the mechanism of proteinuria in nephrotic syndrome patients by using puromycin aminonucleoside (PAN) nephrosis model.

**Methods :** Following administration of various concentrations of PAN and antioxidants we observed the changes of podocyte cytoskeletons in cultured rat glomerular epithelial cells (GEpC) by method of scanning electron microscope, reactive oxygen species (ROS) analysis, permeability assay, confocal microscope, and Western blot assay.

**Results :** PAN not only induced the ultrastructural changes of GEpC, such as shortening and fusion of microvilli, but also separated the intercellular gaps and linear ZO-1. PAN induced oxidative stresses in time and dose dependent manners and increases of intercellular permeability in anti-oxidants inhibitable manners. High concentration of PAN induced not only actin polymerization and disorganization, but also the conglomerulation and internal dislocation of  $\alpha$ -actinin protein. The intensities of fluorescences of ZO-1 protein were diminished and internalized by PAN in a dose-dependent manner, which were inhibited by anti anti-oxidants.

**Conclusion :** PAN induced the changes of podocytes cytoskeleton and junctional barriers by way of increasing ROS in GEpC that resulted in increasing their permeability in a antioxidant-inhibitable manner. Glomerular hyperpermeability induced by PAN mediateing through oxidative stresses is thought to take part in the mechanism of proteinuria in nephrotic syndrome. (Korean J Pediatr 2008;51:54-61)

**Key Words :** Puromycin aminoglycoside, Nephrotic syndrome, Proteinuria, Oxidative stresses, Anti-oxidants

### 서 론

소아 미세변화 신증후군은 단백뇨를 동반하는 주요한 신장환이며, 사구체 여과장벽의 결손 또는 전하장벽의 결손 등이 주요 발병 기전으로 여겨진다. 사구체 여과장벽의 주요 구조로서 사구체 상피세포(glomerular epithelial cells, GEpC)의 손상 역시 이와 연관된 단백뇨의 중요한 발생 요인 중 하나이지만 아직 병태생리

는 명확하지 않다<sup>1)</sup>. 미세변화 신증후군 또는 특발성 신증후군의 병태생리의 연구는 직접 환자의 임상상이나 치료 등을 통한 연구와 더불어 특발성 신증후군과 유사한 puromycin aminonucleoside(PAN) 유발성 신증후군 동물모델을 사용하여 이루어져 왔다<sup>2)</sup>. PAN 신증 동물모델은 PAN을 백서에게 정주하여 발생하는 단백뇨나 GEpC에 특이적인 손상과 조직학적 변화(죽돌기의 편평화와 탈락)는 특발성 신증후군의 임상조직상과 매우 유사하다<sup>2-4)</sup>. 또한, 생화학적으로도 전하장벽이 감소한다는 측면에서 특발성 신증후군과 유사하므로 PAN 신증은 특발성 신증후군의 병태생리에 관한 연구대상으로도 많이 이용되고 있다<sup>5-8)</sup>. 한편, Fishman과 Ricardo 등<sup>9, 10)</sup>은 생체 외 실험, 즉, 배양된 GEpC에 미치는 PAN의 영향을 통해서도 PAN신증에서 보이는 특이적인 세포독성을 관찰할 수 있었다고 보고하였다.

이 연구의 목적은 배양한 GEpC에 단백뇨를 유발시키는 PAN

접수 : 2007년 10월 11일, 승인 : 2007년 11월 25일

이 연구는 2006년 대한소아신장학회 와이어스 지원연구비와 대한소아신장학회 한독연구비, 2007년 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(RO1-2007-000-20856-0).

책임저자 : 하태선, 충북대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Tae Sun Ha, M.D.

Tel : 043)269-6374 Fax : 043)269-6041

E-mail : tsha@chungbuk.ac.kr

을 적용시킴으로써 나타나는 GEpC의 세포골격구조의 형태학적 변화와 함께 사구체여과율의 변화, 유전자차원의 변화, 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)를 연구함으로써 특발성 신증후군에서 보이는 단백뇨의 기전을 생체 외 PAN 신증모델을 통하여 설명하고자 하였다.

**대상 및 방법**

**1. GEpC의 배양**

Kreisberg<sup>14)</sup>가 공여한 백서의 GEpC를 배양하여 실험에 이용하였다. 이 세포는 족세포에 비해 뾰뾰하게(compact) 자라는 성질을 지녔으므로 투과율 측정에 합리적이다. 유지배양액으로는 이 세포의 배양에 보편적인 RPMI 1640 media에 fetal bovine serum 10%, Hepes, L-glutamine, insulin, antibiotics를 혼합한 배양액을 사용하였으며, 배양액 교환은 3일에 한번씩 하였다. 세대배양은 0.05% trypsin으로 이탈시킨 후 위의 배양액으로 다시 배양시켰다<sup>15)</sup>.

**2. PAN의 투여**

PAN(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 vehicle로서 ethanol을 이용하여 녹인 후 이것을 여러 가지 농도(0, 5, 25, 50 µg/mL)로 배양액에 투여하여 일정 시간 노출 후 세척하였고, Hank's balanced salts solution(HBSS)으로 교환한 후 세포모양을 관찰하면서 다음의 연구를 수행하였다.

**3. 사구체 상피세포의 미세형태학적 변화**

PAN농도에 따른 세포손상의 형태학적인 조사와 여과율과의 관련성을 위하여 광학현미경과 투사전자현미경으로 관찰하였다. Filter에 자란 세포를 glutaraldehyde로 고정한 뒤 처리과정을 한 후 silver staining을 거쳐 scanning 전자현미경(Hitachi S-570, Japan)으로 PAN의 농도에 따른 미세변화를 관찰하였다.

**4. 세포 내 산소종(이하 ROS)의 측정**

세포 내 산화력을 측정하기 위해서  $1 \times 10^4$ 의 세포를 96 well plate에 균등하게 분주한 후, 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 PAN으로 처치하였다. 다음으로 phenol red-free 배양액으로 씻은 후 11 µM의 dihydrodichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)(Sigma, USA)로 처치하고 무혈청 배지에서 37°C로 1시간 동안 노출시켰다. 그 후 ELISA reader를 이용하여 측정하였다(480 nm excitation and 530 nm emission wavelengths)<sup>16)</sup>. PAN으로 처치한 GEpC 배양액에 probucol, 비타민 C(이하 Vit C로 표기), epigallocatechin gallate (EGCG) 등의 항산화제를 첨가한 후 각각의 ROS의 생성을 측정하였고, 면역현광현미경을 이용하여 GEpC 배양액에 다양한 농도의 PAN을 투여한 경우와 비교하였다.

**5. 투과율(여과율)의 측정**

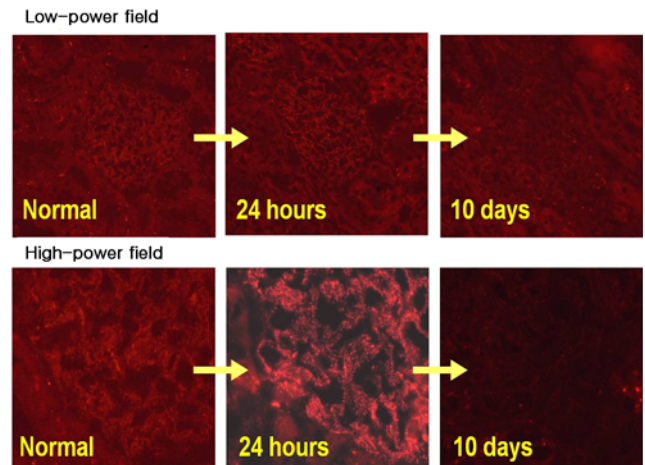
투과성이 있는 구멍크기(pore size)가 0.45 µm 크기의 미세공이 있는 셀룰로오스 반투과성막(Millicell-HA, Millipore Corp., MA, USA) 용기를 24-well 배양용기내부의 배양액 위에 띄운 후(insert), 표면에 GEpC가 단일층으로 자라게 하였다. 양측(apical and basolateral)에 각각 0.5 mL와 1.5 mL의 새로운 배양액으로 교환하여 apical 면으로 수압(hydrostatic pressure)이 가해지도록 하였다<sup>17, 18)</sup>. 다음 Millicell 배양용기(Millipore, USA)의 basolateral 면(아래부분)에 BSA(10 µg/mL) 10 µL를 넣은 후 3시간 뒤 apical 면으로 배양액을 25 µL씩 취득하여 sandwich ELISA법으로 여과정도를 측정하였다. 투과정도는 투여양에 대한 apical 면으로의 검출량으로 하였으며, GEpC 배양액에 다양한 농도로 PAN을 투여한 경우와 PAN으로 처치한 GEpC배양액에 항산화제를 첨가한 경우를 서로 비교하였다.

**6. 면역현광현미경 영상**

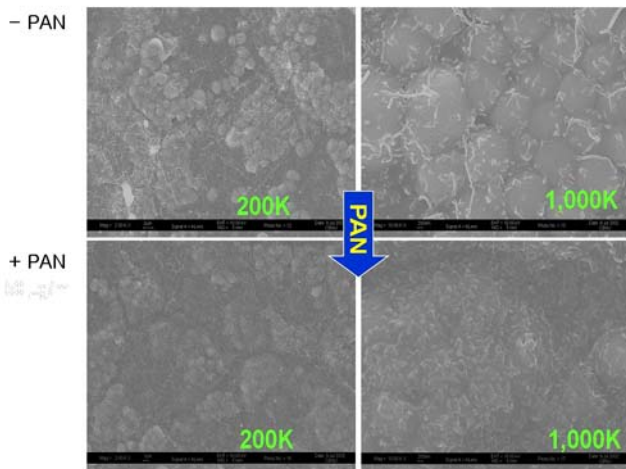
Collagen I(UBI, USA)이 코팅되어 있는 커버글라스에 GEpC를 배양하고 PAN과 항산화제를 2시간동안 처리하였다. GEpC를 paraformaldehyde로 고정한 후 anti-ZO-1 Ab(Zymed, San Francisco, CA, USA) 등을 같이 배양시켰다.

**7. Confocal microscopy를 통한 α-actinin과 F-actin의 분포변화 관찰**

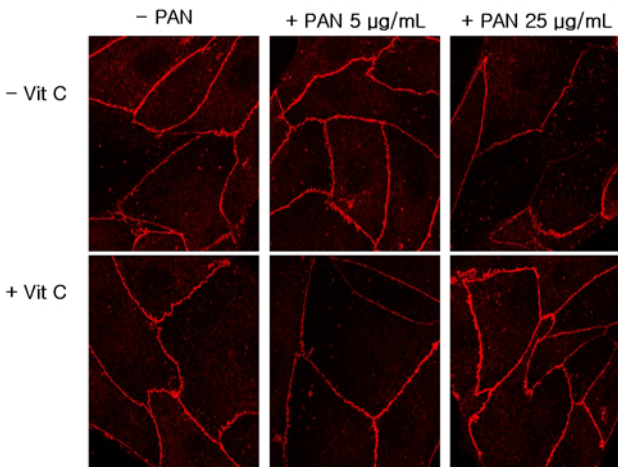
세포를 collagen type-I(Upstate biotechnology incorporation, USA)으로 코팅한 커버글라스에 각각의 조건으로 배양하고 confluent해지면 PBS로 3번 세척을 해준 후 4% paraformaldehyde를 200 µL씩 실온에서 10분간 처리하여 세포를 고정하였다. 고정에 사용된 paraformaldehyde의 aldehyde기를 제거하기 위해 0.02 M glycine이 들어있는 PBS를 이용하여 3번 세척하였



**Fig. 1.** Expression of ZO-1 in puromycin aminonucleoside nephropathy model with a time variable (low power  $\times 200$ , high power  $\times 1,000$ ).

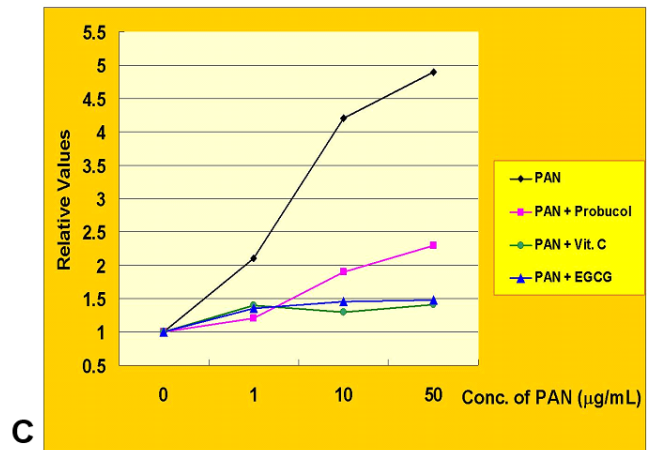
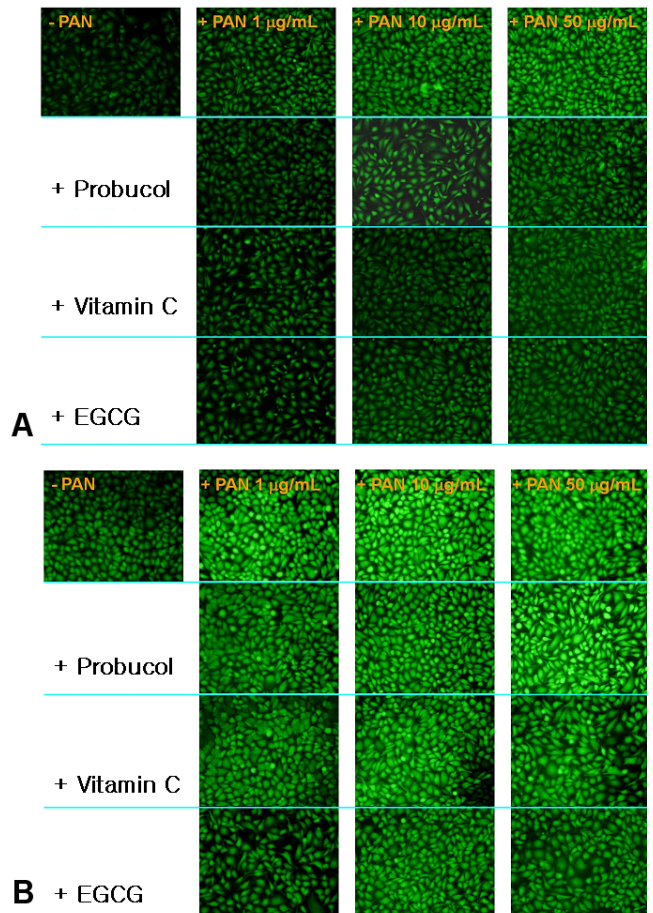


**Fig. 2.** Scanning EM findings of glomerular epithelial cells in puromycin aminonucleoside nephropathy model.



**Fig. 3.** Immunofluorescent microscopy of confluent glomerular epithelial cells with anti-ZO-1 antibody (TRICTC-Conjugated).

다. 그 후 blocking 작용을 위해 10% normal goat serum을 well 당 200 µL씩 처리하여 37°C에서 30분간 배양한 다음 goat serum을 버리고 monoclonal mouse 항 rat  $\alpha$ -actinin-4(EA-53; A7811; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 항체를 1:50으로 희석하여 well 당 200 µL씩 37°C에서 1시간 배양한 뒤 PBS를 이용하여 10분간 3번씩 세척하였다. 이차항체를 우선 1:400으로 희석하여 37°C에서 30분간 배양하고 0.1% triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 2번 세척한 후 다시 PBS로 2번 10분간 세척을 하였다. Actin을 염색하기 위해 F-actin phalloidin-TRITC(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 1:40으로 희석한 후 검체 당 200 µL씩 37°C에서 30분간 반응시켰다. 다음 triton X-100이 들어있는 PBS로 10분간 3번 세척을 하고 다시 PBS로 2번 세척을 하였다. Slide glass위에 mount media를 적당량 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮어 관찰하기 전까지 4°C에서



**Fig. 4.** A) Reactive oxygen species production for 3 hrs in puromycin aminonucleoside model in an antioxidant-inhibitable manner (DCF-DA staining). B) Reactive oxygen species production for 24 hrs in puromycin aminonucleoside model in an antioxidant-inhibitable manner (DCF-DA staining) C) Quantification of reactive oxygen species production with a puromycin aminonucleoside concentration variable.

보관하고 관찰은 Fluorescence microscope (TCS SP2 AOBS, Leica, Germany)으로 FITC-conjugated는 emission 496 nm-534 nm, excitation 488 nm의 파장으로, TRITC-conjugated는 emission 555-635 nm, excitation 543 nm의 파장으로 항원의 분포변화를 관찰하였다. 양의 변화는 각각의 검체에 대한 대조염색을 병행하여 영상분석법(image analysis program)을 이용한 분석을 통하여 실험 각 군과 대조군의 염색정도를 수치화하여 비교하였다<sup>19)</sup>.

**결 과**

PAN 신증 생체 외 모델의 광학현미경관찰상 시간이 지날수록 GEpC에서 사구체여과장치의 해체 및 세포간 틈이 벌어지는 양상을 보였다(Fig 1).

PAN 신증 생체 외 모델에서 scanning 전자현미경관찰상 50 µg/mL의 PAN 투여시 GEpC의 미세용모세포들이 짧아지고, 융합되는 양상을 보였다(Fig 2).

PAN 신증 생체 외 모델에서 anti-ZO-1 항체를 처리후 면역현광현미경 관찰상 PAN의 농도가 올라갈수록 ZO-1은 선형으로 재배열을 보였고, Vit C는 ZO-1의 재배열을 억제하는 양상을 보였다(Fig 3).

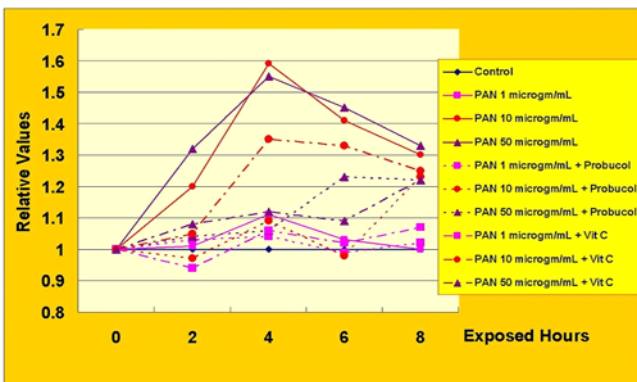
PAN은 시간과 농도에 비례하여 ROS를 많이 생성하였고, probucol, Vit C, EGCG와 같은 항산화물질에 의해 억제되었다(Fig. 4).

PAN의 농도가 증가할수록 사구체여과율이 증가하였고, probucol과 Vit C에 의하여 억제되었다(Fig. 5).

고농도의 PAN은 GEpC에서 actin 중합반응 및 해체반응을 보이며, probucol과 Vit C에 의해서 억제된다(Fig. 6).

고농도의 PAN은 GEpC에서 α-actinin 단백질의 응고(conglomerulation)와 내진위를 일으키며, probucol과 Vit C에 의해서 억제된다(Fig. 7).

PAN 신증 생체 외 모델에서 면역현광현미경상 ZO-1 단백질의

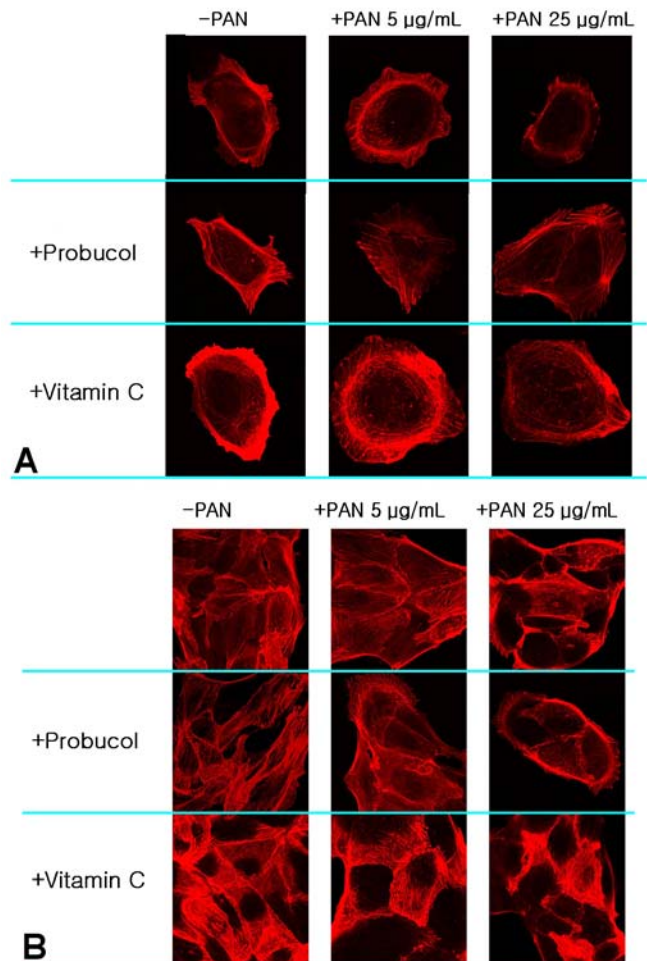


**Fig. 5.** Permeability assay of glomerular epithelial cells in vitro in puromycin aminonucleoside nephropathy model with concentration and time variables in a antioxidant-inhibitible manner.

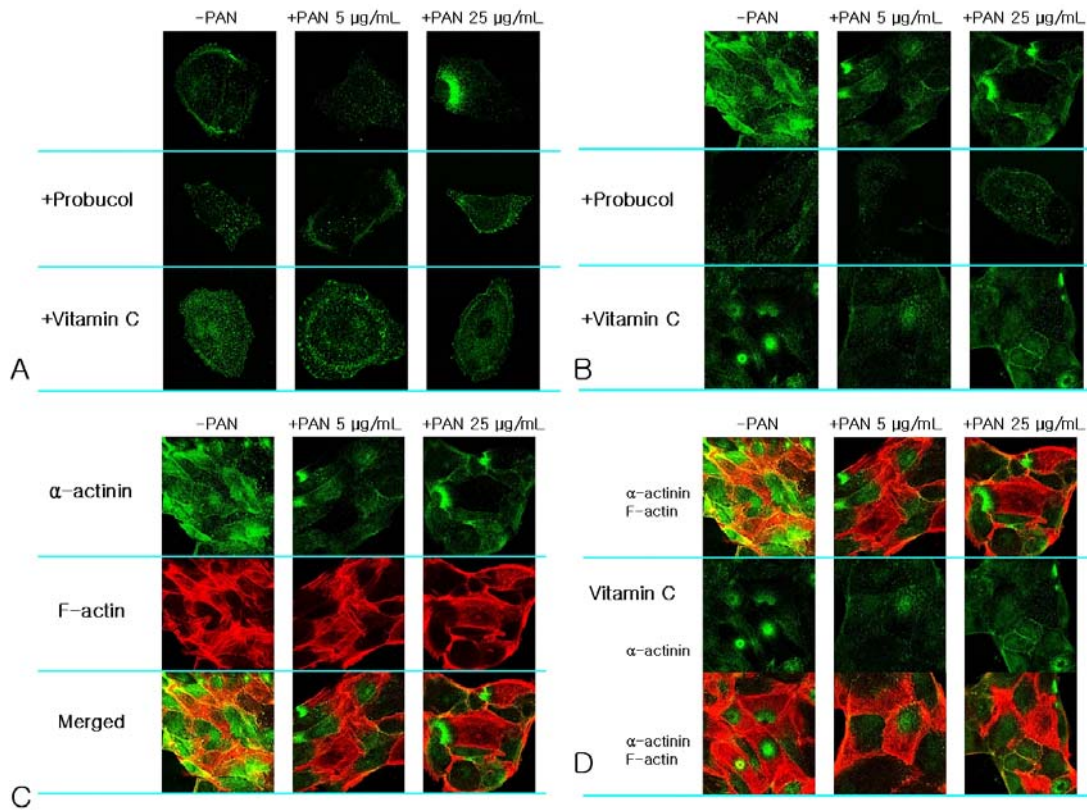
형광강도가 PAN 의 농도에 비례하여 감소하며, Vit C에 의해서 억제된다(Fig. 8).

**고 찰**

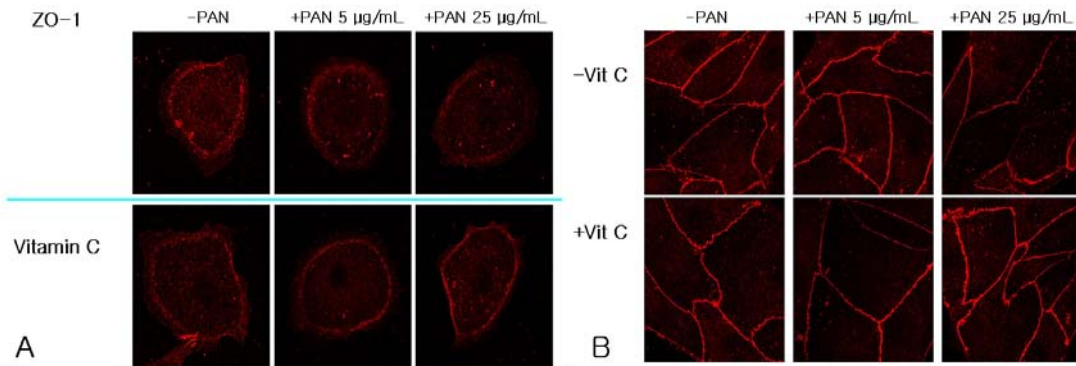
GEpC는 사구체기저막, 내피세포와 함께 사구체 상피세포의 구조적 또는 전하적 특성을 유지하고 사구체기저막을 생성하여 사구체 여과능과 연관된 중요한 역할을 한다<sup>21, 22)</sup>. 그 동안 사구체여과능과 관련된 상피세포의 생체 외 배양연구의 경우 GEpC형태학적변화의 관찰에 있어서는 정량적으로 한계가 있지만 배양 환경아래서의 상피세포의 형태변화와 사구체기저막성분으로 알려진 세포외 기질성분의 합성과 변화 등에 관하여 집중되어 이루어져왔다<sup>22)</sup>. 또한, GEpC는 소아 특발성 신증후군의 병태생리와 아주 밀접한 관련이 있음이 알려져 있으므로<sup>23)</sup>, 특발성 신증후군에 관



**Fig. 6.** A) Distribution of actin filaments in a single glomerular epithelial cell (TRITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in a antioxidant-Inhibitible manner. B) Distribution of actin filaments in confluent glomerular epithelial cells (TRITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in a antioxidant-inhibitible manner.



**Fig. 7.** A) Distribution of  $\alpha$ -actinin in a single glomerular epithelial cells (FITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in a antioxidant-inhibitable manner. B) Distribution of  $\alpha$ -actinin in confluent glomerular epithelial cells (FITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in a antioxidant-inhibitable manner. C) Distribution of  $\alpha$ -actinin and F-actin in a single glomerular epithelial cell (FITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable. D) Distributional changes of  $\alpha$ -actinin and F-actin by vitamin C with a puromycin aminonucleoside concentration variable.



**Fig. 8.** A) Immunofluorescent microscopy of a single glomerular epithelial cell with anti-ZO-1 antibody (TRITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in vitamin C-inhibitable manner. B) Immunofluorescent microscopy of confluent glomerular epithelial cells with anti-ZO-1 antibody (TRITC-Conjugated) with a puromycin aminonucleoside concentration variable in vitamin C-inhibitable manner.

한 한 GEpC의 생체 내 혹은 생체 외 연구는 매우 중요한 비중을 차지한다.

소아에서 특발성 신증후군은 단백뇨를 유발하는 신질환 중 대표적인 질환으로, 단백뇨를 일으키는 기전으로서 GEpC의 손상으

로 인한 사구체 여과장벽의 결손이나 음전하장벽의 결손 등으로 설명하고 있으나<sup>23)</sup>, 아직도 정확한 병태생리가 밝혀져 있지않다<sup>4)</sup>

7). 사구체 여과장벽과 음전하장벽은 사구체여과능과 밀접한 관련이 있다<sup>23)</sup>. 사구체 상피세포는 족돌기와 slit diaphragm 등과 함

계 사구체 여과장벽을 구성한다<sup>5)</sup>. 그리고 상피세포 표면의 음전하는 사구체여과능에 중요한 역할을 한다<sup>6)</sup>.

이러한 특발성 신증후군의 병태생리 연구를 위해서 직접 환자의 임상양상이나 치료를 통한 임상연구도 시행되지만, 특발성 신증후군과 유사한 동물모델이나 생체의 실험을 통한 간접적인 연구가 진행중에 있다<sup>9)</sup>. 이중 PAN을 정주하여 단백뇨를 발생하게 하고, GEpC에 족돌기의 편형화와 탈락 등의 특이적인 손상과 조직학적 변화를 유도할 수 있는데, 이는 특발성 신증후군에서 보이는 조직학적 소견과 매우 유사하며, 이를 PAN 신증(PAN nephrosis)이라 한다<sup>8-10)</sup>. 또한, 생화학적으로 나타나는 전하장벽의 감소소견 역시 유사하므로 PAN 신증은 특발성 신증후군의 병태생리에 관한 연구대상으로 많이 이용되고 있다<sup>11-14)</sup>. 한편, 만성 PAN신증에서는 국소성 분절성 사구체 경화증과 유사한 소견을 보이므로, 세포 외 기질의 역할에 대한 연구에서도 PAN신증모델을 이용할 수 있다<sup>15)</sup>. PAN신증에서 보이는 이러한 GEpC의 변화들은 생체 외 실험, 즉 배양된 GEpC에서도 특이적인 세포독성(cytotoxicity) 등으로 유사하게 나타남을 발견할 수 있다<sup>16, 17)</sup>.

PAN이 신증을 유발시키는 기전으로는 GEpC의 족돌기의 소실, 부분적 결손, 미용모의 출현 등 사구체 간벽의 구조적 이상과 전하장벽의 감소를 들 수 있다<sup>9)</sup>. 이러한 구조적 또는 생화학적 변화가 다음과 같은 인자들에 의해 유발된다고 여러 연구자들에 의해 제시되고 있다. 즉, cytokine 특히 monocyte/macrophage 등과 관련된 tumor necrosis factor, interleukin-1, platelet-activating factor<sup>18, 19)</sup>, thromboxane A2, leukotriene 등의 eicosanoids<sup>20)</sup>, 후에 언급할 ROS<sup>21-25)</sup>, lipid<sup>26)</sup>, 면역학적 요인<sup>27)</sup> 등이다.

ROS는 세포내 뿐만아니라 세포외에서도 발생하며 세포의 성분들을 파괴할 수 있어서 신손상을 유발하는 인자들 중 하나이다. 많은 신질환들 뿐 아니라 신증후군의 모델인 PAN 신증<sup>21)</sup>이나 adriamycin-유발성 신증<sup>28)</sup>에서도 ROS가 관찰되며, 유발성 신증(nephrosis)을 유발하는 중요한 인자로 여겨지고 있다. 더구나 allopurinol, superoxide dismutase, probucol 등의 항산화제에 의해 사구체 상피세포의 손상이나 음전하부위의 감소가 회복됨으로써<sup>22-24)</sup> 이를 뒷받침해 주고 있다. 이에 대한 생체 외 실험에서는 신피질 절편을 PAN에 노출시켰을 때  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO \cdot$  등이 생성되고 족돌기의 변형이 초래되었으며, probucol이나  $\alpha$ -tocopherol/ascorbic acid같은 항산화제에 의해 이러한 변화가 소실되었다<sup>25)</sup>. Nash 등<sup>23)</sup>은 배양된 GEpC에 PAN을 투여시 세포가 구조적으로 변형되었고, catalase 등의 항산화제에 의하여 이러한 변화가 감소하는 것으로 미루어 ROS가 PAN신증에서 단백뇨를 유발하는 인자라고 주장하였다. 그러나 단백뇨의 발생과 밀접한 관련이 있는 사구체 기저막 성분의 변화는 아직까지도 연구가 미흡하다. 본 연구는 PAN 신증 모델에서 보이는 치밀이음부 단백질인 ZO-1의 재배열 및 내전위, GEpC의 ROS생성, PAN으로 유도된 사구체여과율의 증가 그리고 actin 과  $\alpha$ -actinin의 구조적 변형 등을 항산화물질이 억제하였음을 증명하였다. 이는 PAN신

증 모델에서 발생하는ROS가 족돌기의 형태학적 변화를 유도하여 사구체여과율의 상승을 초래할 수 있음을 반증하는 것이며, 또한, 신증후군환아에서 단백뇨의 발생기전에서의 ROS역할을 강하게 시사하는 결과이다. 뿐만 아니라, ROS가 GEpC의 구조를 이루는 actin과  $\alpha$ -actinin에 직접 영향을 주어 사구체여과에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

앞으로 단백뇨의 발생기전에 기여하는ROS의 역할에 대해서 좀 더 많은 연구들이 있어야 될 것으로 생각되며, 이 연구가 그 밑바탕이 되었으면 하는 것이 본 저자들의 바램이다.

## 요 약

**목적** : 특발성 신증후군의 연구를 위하여 병태생리 및 임상소견과 유사한 실험적 puromycin aminonucleoside(PAN) 신증을 이용하는 데 본 연구는 배양된 사구체 상피세포에 대한 PAN의 영향을 통하여 신증후군의 주 원인 병태생리인 단백뇨의 기전을 밝히고자 하였다.

**방법** : 사구체 상피세포를 배양한 후 다양한 농도의 PAN과 항산화제를 투여하여 전자현미경관찰, 반응성 산소종 투과율 변화, confocal microscopy 등을 통하여 족세포성분의 변화를 관찰하였다.

**결과** : 사구체 상피세포의 초고배율소견에서 PAN에 의해 세포 간극이 벌어지고 표면의 미세돌기가 단축되는 변화를 볼 수 있었다. 이러한 세포간극의 변화는 세포막부분의 ZO-1에 대한 면역형광검사에서도 확인할 수 있었다. DCF-DA로 측정된 반응성 산소종은 PAN에 의하여 농도에 따라 투여 2시간에 이미 유의한 증가를 보이거나, 이러한 변화는 항산화제인 EGCG, probucol, vitamin C에 의해 감소하였다. 또한, 세포단층모델에서 투과율은 PAN에 의하여 농도에 따라 증가하나 항산화제에 의해 증가가 억제되었다. 세포골격구조인  $\alpha$ -actinin은 사구체 상피세포의 세포질과 바깥 세포막부분으로 actin과 같이 분포하나 고농도의 PAN에 의해 세포질 바깥쪽의 일부에 집중하는 형상으로 변화하였다. 그러나 이러한 변화는 항산화제인 vitamin C의 처치에 의해 예방될 수 있었다. 세포막성분인 ZO-1은 고농도의 PAN에 의해 안쪽으로 이동하고 집중하는 형상으로 변화하였으나, vitamin C의 처치에 의해 예방되었다. 이와 함께  $\alpha$ -actinin과 ZO-1은 PAN에 의해 단백질량이 감소하였으나 이는 항산화제에 의해 예방할 수 있었다.

**결론** : PAN은 사구체 상피세포의 반응성 산소종 생성을 증가시키고, 구조성분의 변화를 통하여 형태학적인 변화를 초래하며 이는 투과율의 증가로 나타났다. 이러한 변화들은 항산화제에 의해 어느 정도 억제할 수 있었으므로, PAN은 생체 외 사구체 상피세포에 산화스트레스기전을 통하여 구조적 변화와 이에 따른 단백뇨를 유발시키는 것으로 사료된다.

## References

- 1) Nash MA, Edelmann CM Jr, Burnstein J, Barnett HL. Minimal change nephrotic syndrome, Diffuse mesangial hypercellularity, and focal glomerular sclerosis. *Pediatric Kidney Disease*. 2nd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1992;1267-90.
- 2) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-32.
- 3) 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.
- 4) Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987;126:220-9.
- 5) Caulfield JP, Farquhar MG. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1978;39:505-10.
- 6) Alcorn D, Ryan GB. Distribution of anionic groups in the glomerular capillary wall in rat nephrotoxic nephritis and aminonucleoside nephrosis. *Pathology* 1981;13:37-50.
- 7) Mynderse LA, Hassell JR, Kleinman HK, Martin GR, Martinez-Hernandez A. Loss of heparin sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab Invest* 1983;48:292-302.
- 8) Quatacker J. Alterations in the sialic acid content of the rat glomerular filter in aminonucleoside nephrosis. *Virchows Arch* 1986;50:237-47.
- 9) Fishman JA, Karnovsky MJ. Effects of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1985;118:398-407.
- 10) Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in aminonucleoside nephrosis: In vitro studies. *Kidney Int* 1994;45:1057-69.
- 11) Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3005-15.
- 12) Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic(re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19:130-7.
- 13) Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001;108:1583-7.
- 14) Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1978;14:21-30.
- 15) Ha TS. High glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) modulate CD2AP expression in glomerular epithelial cells. *Korean J Nephrol* 2005;24:709-17.
- 16) Hammes M, Singh A. Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayers to albumin. *J Lab Clin Med* 1994;123:437-46.
- 17) Pegoraro AA, Singh AK, Arruda JA, Dunea G, Bakir AA. A simple method to detect an albumin permeability factor in the idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2000;58:1342-45.
- 18) Song CJ, Ha TS, Lee HS, Yun OJ. Effects of angiotensin II on glomerular epithelial cells on permeability model; Role of oxidative stress. *Korean J Nephrol* 2004;23:396-404.
- 19) Ha TS. High glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) modulate  $\alpha$ -actinin-4 expression in glomerular epithelial cells. *Korean J Nephrol* 2004;23:694-702.
- 20) 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;70:1585-90.
- 21) Groggel GC, Stevenson J, Hovingh P, Linker A, Border WA. Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int* 1988;33:517-23.
- 22) Daniels BS. The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol* 1993;13:318-23.
- 23) Nash MA, Edelmann CM Jr, Burnstein J, Barnett HL. Minimal change nephrotic syndrome, Diffuse mesangial hypercellularity, and focal glomerular sclerosis. *Pediatric Kidney Disease*. 2nd ed. Boston: Little, Brown and Company, 1992;1267-1290.
- 24) Walker F. The origin, turnover and removal of glomerular basement membrane. *J Pathol* 1973;110:233-44.
- 25) Farquhar MG. The primary glomerular filtration barrier-basement membrane or epithelial cells? *Kidney Int* 1975;8:197-211.
- 26) Kerjaschki D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell(podocyte) in glomerular diseases. *Kidney Int* 1994;45:300-13.
- 27) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975;8:219-32.
- 28) 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.
- 29) Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987;126:220-9.
- 30) Caulfield JP, Farquhar MG. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1987;39:505-10.
- 31) Alcorn D, Ryan GB. Distribution of anionic groups in the glomerular capillary wall in rat nephrotoxic nephritis and aminonucleoside nephrosis. *Pathology* 1981;13:37-50.
- 32) Mynderse LA, Hassell JR, Kleinman HK, Martin GR, Martinez-Hernandez A. Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab Invest* 1983;48:292-302.
- 33) Quatacker J. Alterations in the sialic acid content of the rat glomerular filter in aminonucleoside nephrosis. *Virchows Arch* 1986;50:237-47.
- 34) Glasser RJ, Velosa JA, Michel AF. Experimental model of focal sclerosis.(1): Relationship to protein excretion in

- aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977;36:519-26.
- 35) Fishman JA, Karnovsky MJ. Effects of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1985;118:398-407.
  - 36) Weinstein T, Cameron R, Katz A, Silverman M. Rat glomerular epithelial cells in culture express characteristics of parietal, not visceral, epithelium. *J Am Soc Nephrol* 1992; 1279-87.
  - 37) Diamond JR, Pesek I. Glomerular tumor necrosis factor and interleukin 1 during acute aminonucleoside nephrosis: An immunohistochemical study. *Lab Invest* 1991;64:21-7.
  - 38) Gomez-Chiarri M, Ortiz A, Lerma JL, Lopes-Armada JL, Mampaso F, Gonzalez E, et al. Involvement of tumor necrosis factor and platelet-activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab Invest* 1994; 70:449-59.
  - 39) Shibouta Y, Terashita Z, Imura Y, Shino A, Kawamura M, Ohtsuki K et al. Involvement of thromboxane A2, leukotrienes and free radicals in puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Kidney Int* 1991;39:920-9.
  - 40) Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 1986;35:1093-106.
  - 41) Trachtman H, Del Pizzo R, Futterweit S. Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Am J Physiol* 1992;262:F117-23.
  - 42) Kawaguchi M, Yamada M, Wada H, Okigaki T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* 1992;72:329-40.
  - 43) Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1974-86.
  - 44) Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in aminonucleoside nephrosis: In vitro studies. *Kidney Int* 1994;45:1057-69.
  - 45) Diamond JR, Karnovsky MJ. Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol. *Kidney Int* 1987;2:671-7.
  - 46) Fujiwara Y. An ultrastructural study of the effect of the steroid in Puromycin aminonucleoside nephrosis in rats [abstract]. *Virchows Arch* 1984;405:11-24.
  - 47) Bertelli R, Ginevri F, Gusmano R, Ghiggeri GM. Cytotoxic effect of adriamycin and agarose-coupled adriamycin on glomerular epithelial cells: Role of free radicals in vitro cell. *Dev Biol* 1991;27:799-804.