

당뇨병성 신증에서 사구체 족세포 (podocyte)의 손상 기전

순천향대학교 천안병원 내과학교실 및 임상의학연구소, 연세대학교 원주의과대학 내과학교실¹

이은영 · 송재숙 · 정춘희¹ · 홍세용

Mechanism of Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy

Eun-Young Lee, Jaesook Song, Choon Hee Chung¹, Sae Yong Hong

Department of Internal Medicine and Clinical Research Institute, Soonchunhyang University Cheonan Hospital, Cheonan, Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju¹, Korea

- Abstract -

Background: Since podocytes are involved in the maintenance of filtration barrier and normal structure in the kidney, podocyte injury can cause the disturbance of glomerular permselectivity and resultant proteinuria, and recent evidence shows that podocyte injury is associated with oxidative stress. However, the pathogenetic mechanism of podocyte injury in the development of diabetic nephropathy is not known. Thus, the present study examined the effect of high glucose level on cytoskeleton, slit diaphragm, podocyte-glomerular basement membrane interaction, and oxidative stress in cultured podocytes.

Methods: Differentiated cultured podocytes were used in this study. Quiescent cells were incubated with culture media containing 30 mM glucose for 48 hours. The amounts of integrin $\alpha 3$, vinculin, zona occludens (ZO)-1 and fibronectin protein expressed by podocytes were measured by Western blot analysis. Dichlorofluorescein diacetate-sensitive intracellular reactive oxygen species (ROS) were observed by confocal microscope and quantified by quantification software. Thiobarbituric acid reactive substances were also measured. Podocytes incubated with culture media containing 5.6 mM glucose were used as control.

Results: Integrin $\alpha 3$ expression was significantly decreased in podocytes cultured under high glucose level compared to control. However, vinculin and ZO-1 expressions were significantly increased in podocytes cultured under high glucose level compared to control. Fibronectin protein secreted by podocytes was also increased in podocytes cultured under high glucose level compared to control.

ROS and thiobarbituric acid reactive substances in podocytes were also increased in high glucose medium compared to control.

Conclusion: High glucose-induced oxidative stress and the changes of integrin $\alpha 3$, ZO-1 and vinculin lead to the alterations of cytoskeleton, intercellular or cell-matrix interactions. This podocyte injury may play a major role in the disturbance of the urinary filtration barrier and the development of proteinuria. These results confirmed the important role of podocyte injury in the development of diabetic nephropathy (J Kor Diabetes Assoc 27:343~351, 2003).

Key Words: Podocyte, Diabetic nephropathy, Integrin $\alpha 3$, Vinculin, Zona occludens-1

서 론

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환이며 당뇨병 환자의 반복적인 입원 및 사망의 주요한 원인이 되는 심각한 합병증이므로, 당뇨병성 신증의 발생 기전의 정확한 규명은 매우 시급한 과제이다.

최근의 연구에 의하면 미세 단백뇨 및 현성 당뇨병성 신증이 있는 경우는 사구체 족세포(podocyte)의 족돌기 너비 (foot process width)가 증가하며^{1,2)}, 당뇨병 초기의 족세포 족돌기 너비의 증가는 족세포 수의 감소 및 잔여 족세포에 의하여 덮여지는 사구체 기저막 면적의 증가와 관련이 있다³⁾. 또한 당뇨병 환자의 족세포 수가 수년 후의 알부민뇨 발생을 예측한다는 보고도 있다⁴⁾. 이러한 사실들을 종합하면 족세포가 당뇨병성 신증의 초기에 매우 중요한 역할을 담당할 것이라고 생각된다. 그러나 현재까지의 당뇨병성 신증의 병인을 규명하고자 하는 연구들은 주로 메산지움 세포의 비대 및 메산지움의 팽창의 원인을 규명하고자 하는 방향으로만 연구가 진행되어 왔으며, 당뇨병에서 족세포의 손상 기전을 규명하고자 하는 연구는 많지 않다.

족세포는 사구체 기저막의 바깥 쪽을 싸고 있으며 족세포의 족돌기는 인접한 족세포의 족돌기와 함께 변형된 폐쇄 소대 (tight junction)의 일종인 slit diaphragm을 형성한다. 이러한 독특한 구조는 사구체의 여과 기능을 극대화하는데 매우 효과적이며, 이러한 구조물은 단백질이 소변으로 나오지 못하도록 하는 최종 여과 장

벽의 역할을 담당한다^{5,6)}. 족세포는 사구체 기저막 단백질의 주요한 생산 공급원이며, 물리적 힘에 대하여 사구체의 모세혈관 다발을 지지하는 기능을 한다⁷⁾. 족세포와 세포외 기질의 부착은 물리적인 힘이 가해지는 동안 구조적 지지 기반을 제공하며, 각 족돌기가 사구체 기저막과 만나는 부분에서 세포 골격과 연결되어 있다. Actin 필라멘트는 $\alpha 3 \beta 1$ integrin 복합체를 통하여 사구체 기저막에 부착되어 있다⁸⁾. 이 구조는 slit diaphragm의 구조를 유지하고 모세혈관 벽을 보호하는 데 필요한 신호를 전달한다. 사구체 기저막과의 상호작용을 통하여 족세포는 모세 혈관의 직경을 안정화시킨다^{6,9)}. 따라서 족세포가 손상되면 사구체의 선택적 투과성의 이상이 초래되어 단백뇨를 발생시킬 수 있을 것으로 생각된다.

한편 산화성 스트레스가 당뇨병성 신증에서 메산지움 세포의 증식 및 세포외 기질의 축적에 관여한다는 사실은 비교적 잘 알려져 있다¹⁰⁾. 또한 미세변화 신증 후군의 동물모델 쥐에서 $\alpha 3$ integrin이 족세포 형태와 사구체 기저막에의 부착을 유지함으로써 사구체의 투과성을 유지하며 이러한 과정이 산화성 스트레스의 증가에 의하여 파괴될 수 있음이 보고된 바 있다¹¹⁾. 그러나 당뇨병성 신증에서 족세포 손상이 산화성 스트레스라는 것을 시사하는 연구는 없는 상태이다.

따라서 본 연구에서는 배양된 족세포에서 고폐도당이 세포 골격 단백질인 vinculin, slit diaphragm 단백질 ZO-1, 세포외 기질 단백질 fibronectin, $\alpha 3$ integrin 및 활성산소종에 미치는 영향을 관찰함으로써, 당뇨병성

환경이 죽세포의 세포 골격, 세포간의 slit diaphragm, 세포와 세포의 기질과의 상호작용에 미치는 영향 및 그 기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 죽세포 배양

생체 내 죽세포의 독특한 형태인 죽돌기를 가지며 간엽 세포의 특성을 가지는 마우스의 죽세포 세포주를 이용하였다¹²⁾. 이 세포주는 SV40의 thermosensitive variant를 transgene으로 가지는 Immortomouse에서 수립된 것으로, 마우스의 γ -interferon에 의하여 T-antigen의 표현을 자극할 수 있도록 하였다. 불활성화시킨 우태아 혈청 (10%), penicillin/streptomycin, glutamine을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 배양하였다. 2~3일마다 배양액을 교환하고 세포들로 배양 용기가 90% 정도 가득 차면 1:10의 비율로 계대 배양하였다. 첫 2회의 계대 배양까지는 50 U/mL, 다음 2회의 계대 배양까지는 20 U/mL, 그 이후는 10 U/mL의 γ -interferon을 배양액에 첨가하고 33℃ 배양기에서 배양하였다. 그 후에는 γ -interferon을 배양액에 첨가하지 않고 37℃ 배양기에서 배양하여 14일 내에 더 이상의 세포 증식은 없는 상태에서 죽돌기를 가지는 성숙한 죽세포를 얻었다. 죽세포 (2×10^5)를 type 1 collagen (Nitta-Gelatin, Japan)으로 표면을 코팅한 6-well plates 위에서 배양하였다. 죽세포가 분화된 후에는 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지에서 24시간 유지하였다. 그 후 5.6 mM 혹은 30 mM의 포도당이 포함된 배양액에서 죽세포를 48시간 배양하였다.

2. Western blot 분석

Bradford method¹³⁾에 따라 단백질의 농도를 결정한 후, cellular extract aliquots를 sodium dodecyl sulfate 및 β -mercaptoethanol이 포함된 sample buffer에 넣고 95℃에서 15분 가열하였다. 5% polyacrylamide gel에서 전기 영동한 후 nitrocellulose 막으로 전이시켰다. 각 일차 항체에 2시간 동안 실온에서 반응시키고 세척한 후 이차 항체에 2시간 반응시켜 세척한 후,

enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham Life Science, Little Chalfont, UK)에 1분간 반응시킨 후 autoradiography를 시행하였다. Positive immunoreactive band는 densitometry로 정량하여 대조군과 비교하여 판독하였다.

일차 항체는 각각 rabbit anti-integrin $\alpha 3$ polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA), rabbit anti-ZO-1 polyclonal antibody (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), mouse anti-vinculin monoclonal antibody (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 및 rabbit anti-mouse fibronectin monoclonal antibody (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다.

3. 활성산소종의 측정

세포를 인산완충액으로 2회 세척한 후 산화에 민감한 형광소식자인 dichlorofluorescein diacetate 5 μ M을 첨가하여 10분 동안 세포배양기에서 세포내로 염료를 유입시켰다. 유입되지 않은 염료는 세척하여 제거하고 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 형광을 측정하여 세포내 생성된 활성산소종을 가시화하고 정량하였다^{14,15)}.

4. 지질과산화물 (thiobarbituric acid reactive substances)의 정량

지질과산화물은 Ohkawa 등이 고안한 방법을 응용하여 측정하였다¹⁶⁾. 죽세포 현탁액 100 μ L를 취하여 100 μ L의 4% sodium dodecyl sulfate와 혼합하여 용해하였다. 400 μ L의 0.8% 4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine (2-thiobarbituric acid)와 400 μ L의 20% acetic acid 용액 (pH 3.5)으로 조성된 반응액을 첨가한 후, 95℃ 수조에서 60분간 유지하였다. 냉수로 반응을 정지시킨 후 원심분리 후 상층을 취하여 spectrofluorometer를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화물은 tetramethoxypropane을 기준물질로 이용하여 측정하였다.

5. 통계분석

모든 값은 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. 각 실험에서 두 군 사이의 비교는 비모수 검정을 사용하여 통

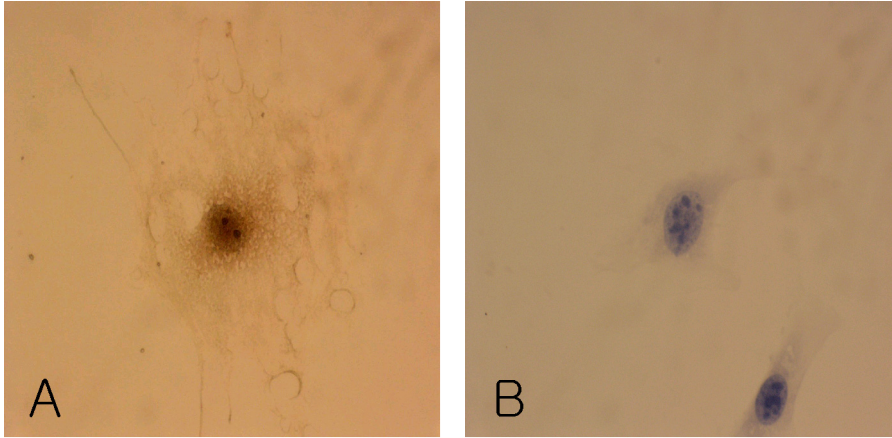


Fig. 1. Characterization of differentiated podocytes in vitro. Immunostaining for synaptopodin, podocyte-specific marker, in cultured podocytes. Whereas the arborized, differentiated podocyte is positive (A, brown) for immunostaining for synaptopodin, the polygonal, undifferentiated cells show negative staining for synaptopodin (B, blue). Original magnification, $\times 400$.

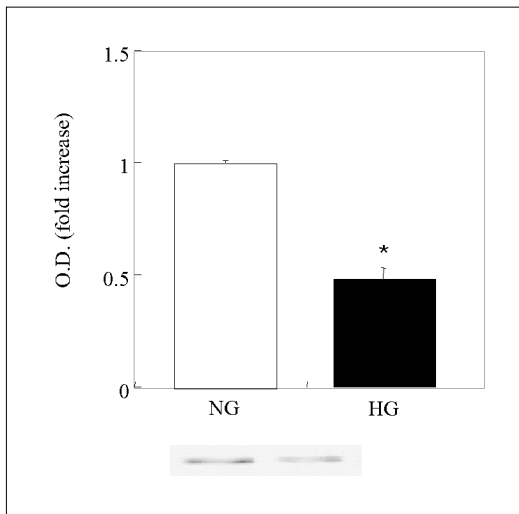


Fig. 2. Effect of high glucose on integrin $\alpha 3$ protein expression by podocytes. Western blotting was performed after exposure of differentiated podocytes to serum free DMEM containing 5.6 (NG) or 30 mM (HG) glucose for 48 hours. Each band was quantified by densitometer. O.D., optical density, * $p < 0.05$ vs. NG.

계적인 분석을 하였다. P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 사구체 족세포의 분화 유도 및 확인

족세포의 배양은 γ -interferon을 배양액에 첨가하고 33℃ 배양기에서 배양하여 세포의 증식을 유도한 후, γ -interferon을 배양액에 첨가하지 않고 37℃ 배양기에서 배양하여 14일 내에 족돌기를 가지는 성숙한 족세포로의 분화를 유도하였다. 족세포의 분화 유무는, 족돌기가 뚜렷해지는 세포의 형태적인 변화의 관찰 및 분화된 족세포의 표지자인 synaptopodin의 면역 염색 양성으로 확인하였다 (Fig. 1).

2. 고포도당 자극시 족세포의 integrin $\alpha 3$, zona occludens-1 (ZO-1), vinculin 및 fibronectin 단백질의 변화

고포도당 (30 mM) 자극시 대조군에 비하여 족세포에서의 integrin $\alpha 3$ 발현은 유의하게 감소한 반면 (0.48 ± 0.05 , $p < 0.05$, Fig. 2), 족세포에서의 ZO-1 ($6.26 \pm$

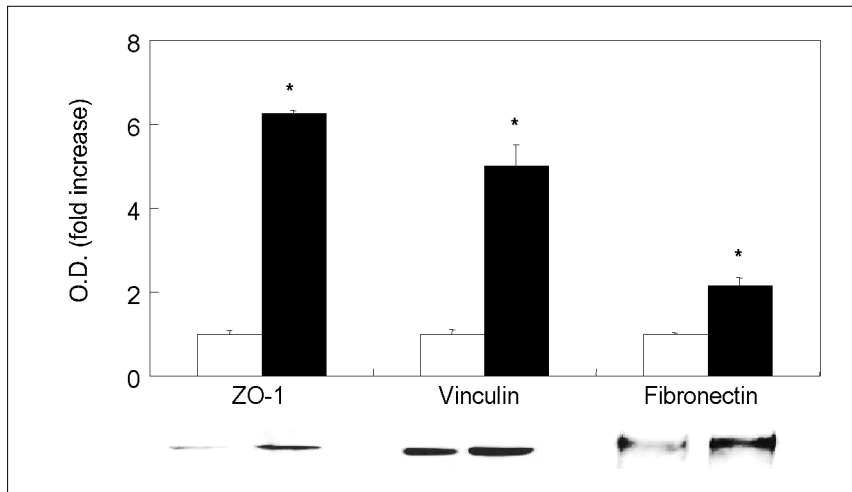


Fig. 3. Effects of high glucose on zona occludens (ZO)-1, vinculin and fibronectin protein expression by podocytes. Western blotting was performed after exposure of differentiated podocytes to serum free DMEM containing 5.6 (NG, white bars) or 30 mM (HG, black bars) glucose for 48 hours. Each band was quantified by densitometer. O.D., optical density, * $p < 0.05$ vs. NG.

Table 1. Lipid Peroxidation Production in Cultured Podocytes

	Concentration of TBARS (ng/mL)	Fold increase
NG	23.9 ± 2.0	1.00 ± 0.08
HG	$62.6 \pm 5.0^*$	$2.62 \pm 0.25^*$

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was measured after exposure of differentiated podocytes to serum free DMEM containing 5.6 (NG) or 30 mM (HG) glucose for 48 hours.

* $p < 0.05$ vs. NG.

0.07, $p < 0.05$, Fig. 3) 및 vinculin (5.15 ± 0.50 , $p < 0.05$, Fig. 3) 단백질 발현은 유의한 증가를 보였다. Fibronectin 발현 역시 유의한 증가를 보였다 (2.14 ± 0.20 , $p < 0.05$, Fig. 3).

3. 족세포에서 고포도당에 의한 활성산소종 및 지질과산화물 생성의 변화

고포도당 (30 mM) 환경 하에서 족세포에서의 활성산소종 (2.16 ± 0.89 , $p < 0.05$, Fig. 4) 및 지질과산화물의 발현은 대조군에 비하여 현저히 증가하였다 (Table 1).

고 찰

본 연구에서는 고포도당에 의한 사구체 족세포에서의 integrin $\alpha 3$, ZO-1, vinculin, fibronectin 단백질 양의 변화 및 산화성 스트레스의 증가를 관찰하였다. 고포도당의 자극에 의한 족세포 자체의 세포 골격, 족세포 간의 slit diaphragm, 족세포와 사구체 기저막의 상호작용 및 사구체 기저막 성분의 이러한 일련의 변화들은 사구체의 투과성을 증가시키고 사구체 기저막을 축적하여 당뇨병성 신증의 특징적인 초기 변화인 단백뇨 및 사구체 기저막의 비후의 원인이 될 수 있을 것으로

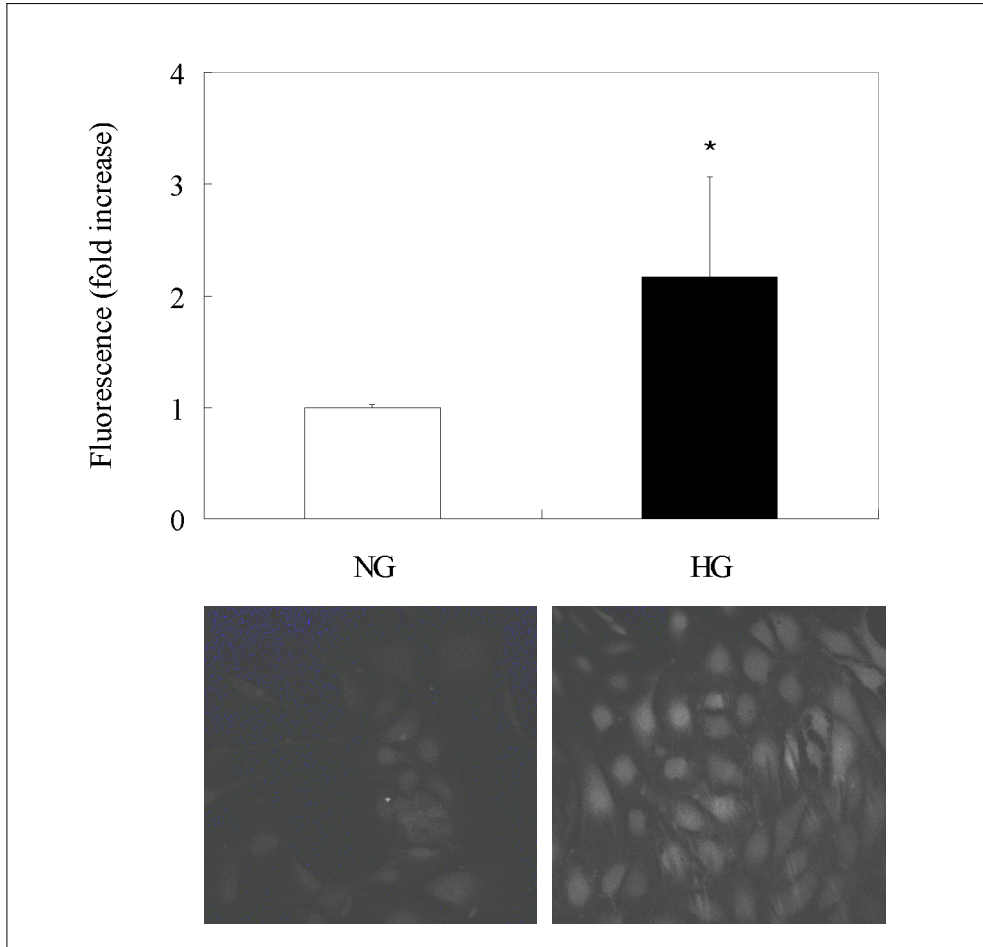


Fig. 4. High glucose-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) generation by differentiated podocytes in vitro. Intracellular ROS was measured after exposure of quiescent podocytes to serum free DMEM containing 5.6 (NG) or 30 mM (HG) glucose for 48 hours. In the end of experiments, cells were washed and exposed by dichlorofluorescein diacetate, then the fluorescence activity of cells was observed and quantified by confocal microscope and quantification software. * $p < 0.05$ vs. NG.

생각된다.

족세포는 정상 사구체의 구조 및 선택적 투과성을 유지하는 데에 중요한 역할을 담당한다^{6,17)}. 족세포에 대한 손상은 사구체의 선택적 투과성의 이상을 초래하고 사구체 기저막의 구조적 변화를 야기하여 단백뇨를 발생시킨다. 그러나 당뇨병에서 족세포의 구조적, 기능적 변화 및 그 기전에 관여하는 잘 알려져 있지 않다.

Integrin은 세포의 기질의 부착에 관여하는 heterodimer로 구성된 당단백으로⁸⁾, 족세포의 actin 필라멘트와 연

결되어 있으며 족세포와 사구체 기저막 사이에 주로 존재하는 것은 integrin $\alpha 3 \beta 1$ 으로 알려져 있다. 단백뇨가 심한 미세변화 신증후군의 동물모델 쥐에서 integrin $\alpha 3$ 발현의 변화가 관찰되었다는 보고들이 있으며¹¹⁾, 당뇨 환자 및 쥐의 신장에서 integrin $\alpha 3$ 발현이 감소되었다는 보고가 있다¹⁸⁾. 따라서 분화된 사구체 족세포를 고폐도당으로 자극하였을 때 integrin $\alpha 3$ 의 발현이 감소한 본 연구의 결과는, 당뇨병에서 고폐도당에 의한 족세포에서의 integrin $\alpha 3$ 발현 감소가 족

세포와 사구체 기저막 사이의 부착력을 감소시키고 족세포의 세포골격을 변화시킴으로써 사구체의 선택적 투과성을 증가시키고 단백뇨를 유발할 수 있다는 것을 시사한다.

ZO-1은 족세포 족돌기의 세포질 내에 존재하는 단백질로 slit diaphragm이 부착되는 부위에 존재하여 사구체 여과 장치의 유지에 중요한 역할을 담당하리라고 생각되고 있다¹⁹⁾. 최근 단백뇨를 동반한 쥐 모델에서 사구체 내 ZO-1 발현의 감소가 관찰되었다는 보고가 있었으나²⁰⁾, 당뇨병성 신증에서 족세포의 ZO-1 변화와의 관계를 살펴본 논문은 없었다. 단백질은 당뇨병성 신증 초기의 특징적인 소견으로, 소변이 여과되는 장치 중 최종 장벽이라고 할 수 있는 slit diaphragm은 족세포와 인접한 족세포 간의 p-cadherin에 기초한 폐쇄소대의 변형된 형태로 간주되고 있으며, 이 cadherin/catenin 복합체는 ZO-1에 의하여 세포의 actin 골격과 연결된다고 생각되고 있다¹⁹⁾. 본 연구에서 관찰된 고포도당에 의한 족세포의 ZO-1의 증가가, 세포골격 및 slit diaphragm에 영향을 주어 단백뇨를 유발하는 직접적인 원인이 되는지 또는 slit diaphragm의 주요 구성 단백질인 nephrin 및 integrin의 감소에 의한 세포와 세포 혹은 세포와 기저막 상호작용의 변화를 보상하기 위한 기전의 일화인지를 밝히기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Vinculin은 actin, myosin II, α -actinin과 함께 족세포 돌기의 세포 골격을 유지하고 있다²¹⁾. 족세포에서의 vinculin은 다른 세포들과는 달리 인접한 족세포와 족세포 사이에 존재하는 폐쇄 소대의 구성 요소가 아니라²²⁾ 족세포를 사구체 기저막에 부착시키는 integrin $\alpha 3 \beta 1$ 복합체를 actin 세포골격에 연결하는 구성 요소 중의 하나로 여겨지고 있다¹⁹⁾. 그러므로 본 연구에서 관찰된 고포도당에 의한 족세포의 vinculin 단백질 증가는, 사구체 여과 장벽의 주요한 구성 요소인 족세포의 세포골격의 변화를 초래하여 단백뇨를 발생시키거나 integrin $\alpha 3 \beta 1$ 복합체의 감소를 보상하기 위한 것으로 생각된다.

초기 당뇨병성 신증은 사구체 기저막의 비후 및 세포외 기질의 축적이 특징적인 병리 소견이며²³⁾, 족세포는 사구체 기저막 단백질의 주요한 생산 공급원으로

type IV collagen ($\alpha 3$ - $\alpha 5$), laminin ($\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$), heparan sulfate proteoglycan 및 fibronectin을 분비한다⁷⁾. 사구체 상피세포를 고포도당으로 자극하면 세포에 의한 세포외기질의 성분 및 양이 변화한다는 보고들이 있었으며^{24,25)}, 본 연구에서도 고포도당 자극에 의하여 족세포에서의 fibronectin 단백질의 증가가 관찰되어 기존의 연구결과와 일치하는 소견을 보였다.

이제까지의 연구자들은 증식이 용이하도록 고안된 족세포를 사용하였는데^{24,25)}, 이 세포들은 생체 내 족세포의 중요한 특징인 족돌기가 없는 다각형의 변형된 상태로서 생체 내의 조건을 적절하게 생체 외 배양조건에서 재현할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 돌기를 가지는 형태로의 분화가 가능한 세포주를 이용하여¹²⁾ 생체 내에서의 유사한 성숙한 형태의 족세포를 얻었으며, 이러한 족돌기를 가지는 형태의 족세포는 이는 생체 내의 족세포 손상 기전을 연구하기에 매우 적합한 세포주이다.

산화성 스트레스가 당뇨병성 신증에서 메산지움 세포의 증식 및 세포외 기질의 축적에 관여한다는 사실은 비교적 잘 알려져 있으며¹⁰⁾, 또한 단백뇨가 심한 미세변화 신증후군의 동물모델 쥐에서 족세포 형태, 사구체 기저막과의 부착성 및 사구체의 투과성이 산화성 스트레스의 증가에 의하여 파괴될 수 있음이 보고된 바 있다¹¹⁾. 본 연구에서도 고포도당 하에서의 족세포에서 활성 산소종 및 지질과산화물이 증가하여 당뇨병에서 족세포의 손상 및 이와 관련된 사구체 투과성의 당뇨병성 신증의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 분화된 사구체 족세포를 고포도당으로 자극하면 integrin $\alpha 3$ 가 감소하고, vinculin, ZO-1, fibronectin 및 산화성 스트레스가 현저히 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 당뇨병성 신증의 초기에 보이는 특징적인 소견인 단백뇨는, 고포도당에 의한 족세포에서의 integrin $\alpha 3$, vinculin 및 ZO-1 단백질의 변화가 족세포의 세포골격, 세포간 slit diaphragm 및 사구체 기저막과의 상호 작용의 변화를 통한 족세포 손상 및 사구체 여과 장치의 장애에 기인한 것이며, 이 과정에서 산화성 스트레스가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

결론적으로 이상의 결과는 고포도당에 의한 족세포에서의 산화성 스트레스의 증가가 당뇨병성 신증에서의 사구체 족세포 손상을 초래하여 사구체의 선택적 투과성의 장애를 야기하고 단백뇨를 유발하는 병태생리에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다고 생각된다.

요 약

연구배경: 사구체 족세포(podocyte)는 정상 사구체의 구조 및 여과 장치의 유지에 중요한 역할을 하므로 족세포가 손상되면 사구체의 선택적 투과성에 이상이 초래되어 단백뇨를 발생시킬 수 있으며, 최근 이러한 족세포 손상에 의한 단백뇨의 발생이 산화성 스트레스와 연관하다는 연구 결과가 있다. 그러나 당뇨병성 신증의 발생에서 족세포 손상의 역할을 규명하고자 하는 연구는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 고포도당에 의한 산화성 스트레스가 족세포의 세포 골격, 세포간 slit diaphragm 및 세포와 사구체 기저막 사이의 상호작용을 변화시키고 족세포의 손상을 초래하여 초기 당뇨병성 신증의 중요한 발생 기전으로 작용하는지를 검색하고자 하였다.

방법: 족세포의 형태학적 특징을 유지하는 분화된 족세포를 유도하여 사용하였다. 고포도당(30 mM)으로 48시간 자극한 후 족세포의 integrin $\alpha 3$, vinculin, zona occludens (ZO)-1 및 fibronectin 단백질 양의 변화는 western blot으로 비교하였다. 또한 활성산소족은 dichlorofluorescein diacetate를 이용하여 공촛점 현미경으로 가시화하고 정량하였으며, 지질과산화물을 같이 측정하여 비교하였다. 대조군은 5.6 mM의 포도당에서 배양한 같은 조건의 족세포를 이용하였다.

결과: 분화된 족세포를 고포도당으로 자극하였을 때, 족세포에서의 integrin $\alpha 3$ 단백질은 감소한 반면, ZO-1 및 vinculin 단백질은 현저한 증가를 보였으며, 족세포에 의해 분비되는 fibronectin 단백질도 현저히 증가하였다. 또한 족세포를 고포도당으로 자극하였을 때 활성산소족 및 지질과산화물의 발현도 현저히 증가하였다.

결론: 고포도당에 의한 족세포에서의 산화성 스트레스의 증가에 의한 ZO-1 및 vinculin의 증가와 integrin $\alpha 3$ 의 감소에 따른 사구체 족세포의 세포골격

의 변화 및 세포와 세포간 혹은 세포와 세포의 기질 단백질의 상호작용의 변화가 사구체 여과 장벽의 장애를 야기하고 단백뇨를 유발하는 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있었다. 따라서 본 연구결과는 당뇨병성 신증의 발생에서 족세포의 역할의 중요성을 제시하는 결과라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bjorn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, Nyberg G, Walker JD, Viberti GC, Osterby R: *Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. Diabetologia* 38:1197-204, 1995
2. Ellis EN, Steffes MW, Chavers B, Mauer SM: *Observations of glomerular epithelial cell structure in patients with type I diabetes mellitus. Kidney Int* 32:736-41, 1987
3. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. J Clin Invest* 99:342-8, 1997
4. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG: *Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. Diabetologia* 42:1341-4, 1999
5. Mundel P, Kriz W: *Structure and function of podocytes: an update. Anat Embryol* 192:385-97, 1995
6. Kriz W, Hackenthal E, Nobling R, Sakai T, Elger M: *A role for podocytes to counteract capillary wall distension. Kidney Int* 45:369-76, 1994
7. Hansen K, Abrass CK: *Role of laminin isoforms in glomerular structure. Pathobiol* 67:84-91, 1999
8. Adler S: *Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. Am J Pathol* 141:571-8, 1992

9. Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley KV: *Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. J Am Soc Nephrol* 5:1731-9, 1995
10. Ha H, Kim KH: *Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. Kidney Int* 51(Suppl.):S18-21, 1995
11. Kojima K, Matsui K, Nagase M: *Protection of alpha(3) integrin-mediated podocyte shape by superoxide dismutase in the puromycin aminonucleoside nephrosis rat. Am J Kidney Dis* 35: 1175-85, 2000
12. Mundel P, Reiser J, Borja AZ, 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* 236:248-58, 1997
13. Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* 72:248-54, 1976
14. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M: *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J Immunol* 130:1910-7, 1983
15. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG: *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J Biol Chem* 272:217-21, 1997
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem* 95:351-8, 1979
17. Kerjaschki D: *Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cells (podocytes) in glomerular diseases. Kidney Int* 45:300-13, 1994
18. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH: *Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. Life Sci* 67:2345-53, 2000
19. 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
20. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G, Remuzzi A: *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. J Am Soc Nephrol* 11:477-89, 2000
21. Drenckhahn D, Franke RP: *Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat and man. Lab Invest* 59:673-82, 1988
22. Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S: *Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. J Cell Sci* 108: 127-42, 1995
23. Adler S: *Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. J Am Soc Nephrol* 5: 1165-72, 1994
24. Danne T, Spiro MJ, Spiro RG: *Effect of high glucose on type IV collagen production by cultured glomerular epithelial, endothelial, and mesangial cells. Diabetes* 42:170-7, 1993
25. van Det NF, Verhagen NAM, Tamsma JT, Berden JHM, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ: *Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. Diabetes* 46:834-40, 1997