

신 사구체 질환에서 Nephrin, Glomerular Epithelial Cell Protein-1 (GLEPP1) 및 WT-1 발현에 관한 연구

김병권 · 김지훈 · 이현순

서울대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2001년 11월 29일
게재승인 : 2002년 1월 21일

책임저자 : 이 현 순
우 110-744 서울시 중로구 연건동 28
서울대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-740-8265
Fax: 02-765-5600
E-mail: Hyunsoon@plaza.snu.ac.kr

Altered Expression of Nephrin, Glomerular Epithelial Cell Protein-1 (GLEPP1) and WT-1 in Glomerular Disease

Byoung Kwon Kim, Ji Hoon Kim and Hyun Soon Lee

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Glomerular epithelial cell protein-1 (GLEPP1) and WT-1 expressed in mature visceral glomerular epithelial cell (VGEC) is required for maintenance of the mature status of VGEC. Nephrin protein is located at the filtration slit and regarded as a molecular component of the slit diaphragm. Alterations of these proteins in proteinuric diseases are not clearly defined. **Methods :** We investigated the expression of GLEPP1, WT-1 and nephrin in 28 renal biopsies diagnosed with minimal change nephropathy (n=10), focal glomerulosclerosis (n=10) and membranous nephritis (n=8) by immunohistochemical staining. Normal control biopsies were obtained from six nephrectomy specimens. **Results :** The patients consisted of 15 males and 13 females. The mean age was 40.7 years. Nephrotic range proteinuria (≥ 3.5 g/day) was noted in 15 (54%) patients. GLEPP1 and nephrin expression were significantly decreased in patients as compared with those of the controls ($p < 0.05$). The mean number of WT-1 expressing cells per glomerulus was also significantly decreased in patients as compared with those of the controls ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in the number of WT-1 expressing cells among the disease groups. **Conclusions :** These results suggest that the loss of biological markers of mature VGEC may play an important role in the pathogenesis of proteinuria.

Key Words : Nephrosis-Lipoid-Glomerulo Nephritis-Biological Markers

신 사구체 상피세포는 후분화 상태(post-mitotic status)에 있는 고도로 분화된 세포로, 사구체 기저막을 합성하고 사구체의 선택적 투과성을 유지하며 모세혈관 토리(capillary tuft)를 물리적으로 지지하는 기능을 담당한다.¹ 성숙한 신 사구체 상피세포는 발달기가 발달해 있으며 인접한 상피세포의 발달기와 꼭지감 구조(interdigitation)를 이루고 있다. 이 발달기와 발달기 사이는 틈새막(slit membrane)으로 연결되어 있어서 사구체의 선택적 투과성의 유지에 깊은 관여를 한다.

심한 단백뇨를 초래하는 신 사구체 질환의 경우 특징적으로 사구체 상피세포에서 틈새막의 수가 감소하고 발달기가 광범위하게 소실되는 등의 형태학적 변화가 공통적으로 관찰된다. 그러나 이러한 형태학적 변화가 일어나는 기전에 대해서는 현재까지 확실히 알려진 바가 없다. 그 이유는, 신사구체 상피세포에서 특이적으로 발현하며 기능하는 분자에 대한 이해가 부족하기 때

문이다. 그러나 최근에는 이에 대한 연구가 활발하게 이루어져 신사구체 상피세포에 특이적으로 발현하는 단백질이 발견되고 있다. 이 중에서 WT-1, Glomerular Epithelial Cell Protein-1 (GLEPP1) 및 nephrin이 신 사구체 상피세포의 기능에 있어서 중요한 단백질로 대두되고 있다.²⁻⁵

GLEPP1은 receptor protein-tyrosine phosphatase family에 속하는 단백질이다.² 이 단백질은 신 사구체 발달 단계상 S-shaped body stage에서부터 신 사구체 상피세포에서 발현하기 시작하며, 성숙한 상피세포에서는 주로 발달기의 꼭대기쪽 막(apical membrane)에 국한되어 존재하므로 발달기의 분화 및 유지에 관여할 것으로 생각된다.³ WT-1은 zinc finger transcription factor로서 신장 발달의 초기에는 모든 미분화 세포에서 발현하며, 발달이 진행될수록 성숙한 사구체 상피세포에만 국한하여 발현한다.⁶ 이 단백질은 세포 증식을 억제하며, 상피세포의 성숙표

현형을 유지할 것으로 생각된다.⁷ 한편, Sharif 등⁸은 미소변화형 신증, focal segmental glomerulosclerosis (이하 FSGS) 및 선천 신증후군 환자의 신 사구체 상피세포에서 GLEPP1의 발현이 소실된다고 보고한 바 있다. 또한, 원발성 collapsing FSGS 및 human immunodeficiency virus (HIV) -associated nephropathy 환자의 사구체에서 GLEPP1, WT-1 등의 발현이 소실된다는 보고도 있다.⁹ 따라서, 병적 상태에서 이들 단백 발현의 이상과 신 사구체 상피세포의 형태학적 변화가 깊은 연관이 있을 것으로 생각되나 아직 이에 대한 연구가 부족한 상태이다.

Nephrin은 염색체 19q13.1에 위치하는 *NPSH1* 유전자에서 만들어지는 단백질이며, 선천 신증후군환자를 대상으로 시행한 연관분석을 통해 이 유전자에 돌연변이가 있음이 밝혀졌다.⁴ 이 유전자로부터 만들어진 nephrin은 정상적으로 발달기 사이에 위치하고 있으며, 이 유전자에 돌연변이가 있는 환자들은 임상적으로 심한 단백뇨를 보인다. 이 단백질이 틈새막을 이루는 물질의 하나로, 사구체의 선택적 투과성을 유지하는 데 중요한 기능을 할 것으로 생각된다.⁵ 병적 상태와 관련하여 이 단백질의 발현 및 기능의 이상에 대해서는 아직 알려진 바가 많지 않다. 그러나 Furness 등¹⁰은, 미소변화형 신증 환자로부터 단일 신 사구체를 추출하여 시행한 역전사중합반응에서 nephrin의 mRNA가 감소되어 있음을 보고한 바 있다. 따라서, 선천 신증후군뿐 아니라 후천적으로 신증후군을 일으키는 신 사구체 질환에서도 nephrin의 이상이 관여할 것으로 생각되나 아직은 더 많은 연구 결과가 필요하다.

따라서, 본 연구자는 후천적으로 신증후군을 일으키는 대표적인 원발성 사구체 질환인 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체 신염을 대상으로 하여, 신 사구체 상피세포가 보이는 형태학적 변화를 관찰하고 면역조직화학 염색을 통하여 GLEPP1, WT-1 및 nephrin의 발현 양상에 어떠한 변화가 있는지 조사하고자 하였다. 또한, 신 사구체의 발달 단계에 따른 각 단백질의 발현 양상에 대해서도 함께 조사함으로써 성숙한 신 사구체 상피세포의 기능에 관여하는 각 단백질의 역할을 규명하고자 하였다.

재료와 방법

환자

1999년 10월부터 2000년 3월까지 서울대학교 병원 병리과에 의뢰되어 미소변화형 신증으로 진단된 10예, FSGS로 진단된 10예 및 원발성 막사구체신염으로 진단된 8예를 대상으로 하였다. 각 환자에서 생검 당시의 연령, 성별, 혈압, 혈청의 총단백, 알부민, 요질소, 크레아티닌, 콜레스테롤 농도, SGOT, SGPT, C3, C4, CH50, 요검사, 24시간 요단백량과 크레아티닌 청소율 등의 임상 검사치를 조사하였다. 대조군으로는 신세포암종으로 진단되어 신장을 적출한 성인 신장 6예를 사용하였다. 또한, 발

달 단계에 따른 각 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 태령 약 20주경 사산되어 부검한 태아의 신장 3예를 대상으로 하였다.

병리조직학적 검사

신생검 조직을 삼분하여 광학현미경, 면역형광현미경 및 전자현미경 검사를 시행하였다. 광학현미경 검사용 조직은 4% paraformaldehyde에 고정된 후 파라핀에 포매하고 연속 박절하였다. 그 후 HE 염색과 Periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 시행하였다. 면역형광현미경 검사용 조직은 Tissue-Tek O.C.T. 혼합체에 포매하고 isopentane에 담가 액화질소에 급냉한 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. 그 후 냉동절편하여 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 부착된 사람의 IgG, IgM, IgA, C3, C1q 및 fibrinogen에 대한 각각의 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행하였다. 전자현미경 검사용 조직은 glutaraldehyde에 고정된 후 1% osmium tetroxide에서 후고정한 다음 epon으로 포매하였다. 포매된 조직에서 $1\ \mu\text{m}$ 두께의 절편을 얻고 1% toluidine blue로 염색한 후, 경화성 변화가 없고 절단면이 중심부를 통과하는 신사구체를 선택하여 LKB ultramicrotome을 이용한 초미세박절을 얻었다. 이것을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 다음 투과전자현미경으로 관찰하였다.

신 사구체 면적의 측정

신 사구체 면적은 현미경에 부착된 디지털 카메라(CCD color camera, IK-T40, Toshiba, Japan)로 영상을 획득한 뒤 형태계측용 프로그램(Image-Pro PlusTM ver 3.1, Media-Cybernetics, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 먼저 200배 시야에서 기준이 되는 눈금자를 영상으로 획득한 뒤 길이를 μm 단위로 표준화하였다. 이후 동일 시야에서 사구체를 영상으로 획득한 뒤 사구체 토리의 외곽선을 기준으로 사구체 토리 면적을 구하였다. 여기서 구한 사구체 면적의 단위는 μm^2 로 나타내었다.

면역조직화학 염색

본 연구에 사용한 일차 항체는 토끼의 다클론 항체인 anti-human GLEPP1 (미국 미시간 대학의 Dr. Roger Wiggins로부터 기증)과 받은 생쥐의 anti-human nephrin 단클론 항체 (핀란드 Oulu대학의 Dr. Vesa Ruotalainen으로부터 기증) 및 토끼의 다클론 항체인 anti-human WT-1 (Santa Cruz, CA, U.S.A.) 등이다. Anti-human GLEPP-1은 1:1600, anti-human WT1과 anti-human nephrin은 1:100으로 희석하여 사용하였다. 면역조직화학 염색은 streptavidin-biotin Kit (LSAB, DAKO, Denmark)를 이용하여 avidin-biotin immunoperoxidase complex (ABC)방법으로 시행하였다. Anti-human GLEPP-1의 염색 과정을 요약하면 다음과 같다. 동결절편을 $4\ \mu\text{m}$ 두께로

잘라 10분간 공기 중에서 건조시킨 후 냉 아세톤 용액에 20분간 고정하고 실온에서 20분간 건조시켰다. 이를 인산염 완충액으로 세척하고 차단혈청으로 20분간 반응시켰다. 여기에 일차 항체인 anti-human GLEPP-1을 가해 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 인산염 완충액으로 세척하고 이차 항체인 biotinylated anti-mouse and anti-rabbit Ig을 가한 후 20분간 반응시켰다. 인산염 완충액으로 세척 후 streptavidin을 30분간 작용시키고 다시 인산염 완충액으로 세척하였다. 여기에 diaminobenzidine (DAB)으로 발색시키고 흐르는 수돗물에 10분간 수세 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다. Anti-human WT1과 anti-human nephrin 염색 과정을 요약하면 다음과 같다. 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 잘라 크실렌과 알코올로 단계적인 탈파라핀 과정을 거쳤다. 구연산 완충액(10 mM, pH 5.0)에 담근 뒤 저주파로 15분간 처리한 후 실온에서 서서히 온도를 낮추었다. 인산염 완충액으로 수세 후 3% 과산화수소수에 5분간 작용시키고 다시 인산염 완충액으로 세척 후 20분간 차단혈청을 반응시켰다. 여기에 일차 항체로 anti-human WT1이나 anti-human nephrin을 가하고 4°C에서 밤 사이 반응시켰다. 이차 항체를 가하고 30분간 반응시킨 뒤 인산염 완충액으로 세척하였고 이를 streptavidin에 30분간 작용시킨 다음 다시 인산염 완충액으로 세척하였다. DAB로 발색시키고 5분간 수세 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다.

GLEPP1과 nephrin의 경우 경화증이 없는 신 사구체를 대상으로 하여, 염색 양상에 따라 다음과 같이 분류하였다. 신 사구체 소방에서 국소적으로 염색상이 완전히 소실된 사구체, 국소적으로 정상에 비해 그 염색 강도가 50% 이상 감소한 신 사구체 및 정상과 동일한 발현 양상을 보이는 신 사구체로 나누어 각각의 경우에 대해 1점, 2점과 3점의 점수를 주고 이 점수의 평균값을 각 환자별로 산출하였다. 그리고 각 질환별로 속해 있는 환자들 사이에서 이 값의 차이를 비교하였다. WT-1의 경우에는 WT-1을 발현하는 신 사구체 내 세포 수를 모든 신 사구체에서 구한 후 평균을 구하여 이를 각 질환별로 비교하였다.

Table 1. Characteristics of patients with glomerular diseases

	MCD	FSGS	MN	Control
n	10	10	8	6
Age (years)	43.4 \pm 18.7	28.2 \pm 16.7	49.1 \pm 13.9	52.1 \pm 15.3
Sex (M:F)	7:3	6:4	3:5	5:1
Nephrotic range proteinuria ^a (n)	6	4	5	NA
Serum albumin (g/dL)	2.2 \pm 0.9	3.0 \pm 1.4	2.5 \pm 0.5	NA
Renal insufficiency ^b	0	0	1	NA
Hypertension (n)	2	2	1	NA
Mean glomerular tuft area (μ m ²)	12,331 \pm 3,524	15,290 \pm 5,936 ^c	14,078 \pm 3,912	12,355 \pm 2,134
Glomerulosclerosis (%)	6.7	28.6	10.1	0

MCD: minimal lesion, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, MN: membranous nephropathy, M: male, F: female, NA: not available.

Values are mean \pm SD. Glomerulosclerosis: mean percentage of glomerulus showing global sclerosis or focal segmental sclerosis.

^aNephrotic range proteinuria: \geq 3.5 g/day.

^bRenal insufficiency: serum creatinine >1.5 mg/dL.

^cp<0.05 by ANOVA.

통계 처리

각 신 사구체 질환에서 구한 평균 사구체면적, 사구체 하나당 WT-1을 발현하는 세포 수, GLEPP1 및 nephrin을 발현하는 정도는 평균 \pm 표준편차로 표기하였다. 이들 값의 차이는 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance) 및 Wilcoxon rank sum test를 통해 분석하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에 의미 있는 것으로 판정하였다.

결 과

임상 소견

환자의 임상병리적 소견은 Tabel 1에 요약하였다. 환자 수는 총 28명이었으며, 이 중 남자는 16명, 여자는 12명이었다. 환자의 연령은 미소변화형 신증은 22세에서부터 69세(43.4 \pm 18.8), FSGS는 5세에서부터 51세(28.2 \pm 16.7), 막성 신증은 22세에서부터 64세까지(49.1 \pm 13.9) 분포하였다. 24시간 요 단백질량은 각각 미소변화형 신증의 경우 6.0 \pm 4.6 g/day, FSGS에서 5.8 \pm 4.3 g/day, 막성 신증에서 6.1 \pm 4.5 g/day였다. 혈중 요질소 수치는 미소변화형 신증에서 22.8 \pm 13.1 mg/dL, FSGS에서 19.2 \pm 9.5 mg/dL 및 막성 신증에서 14.6 \pm 5.3 mg/dL였으며, 혈중 크레아티닌 수치는 각각 미소변화형 신증에서 1.1 \pm 0.6 mg/dL, FSGS에서 0.9 \pm 0.3 mg/dL 및 막성 신증에서 1.0 \pm 0.4 mg/dL였다.

사구체 면적의 형태계측

평균 사구체 토리 면적(mean glomerular tuft area)은 Table 1에 요약하였다. 이 값은 정상 대조군과 미소변화형 신증에서는 유사한 값을 보여 주었고, 막사구체신염과 FSGS 순으

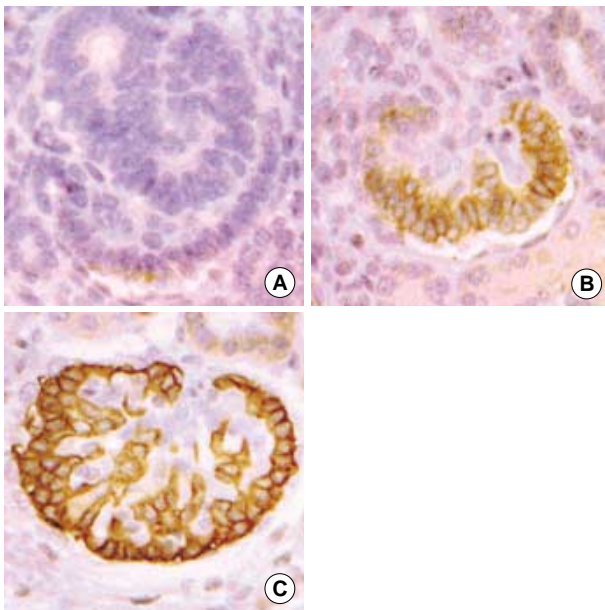


Fig. 1. Glomerular epithelial cell protein-1 (GLEPP1) expression in developing glomeruli. (A) GLEPP1 is weakly expressed in apical surface of the glomerular epithelial cells in S-shaped body stage. (B) In capillary-loop stage, GLEPP1 expression is increased but, still restricted to cell body. (C) Mature glomerulus shows linear staining pattern of GLEPP1 along capillary wall.

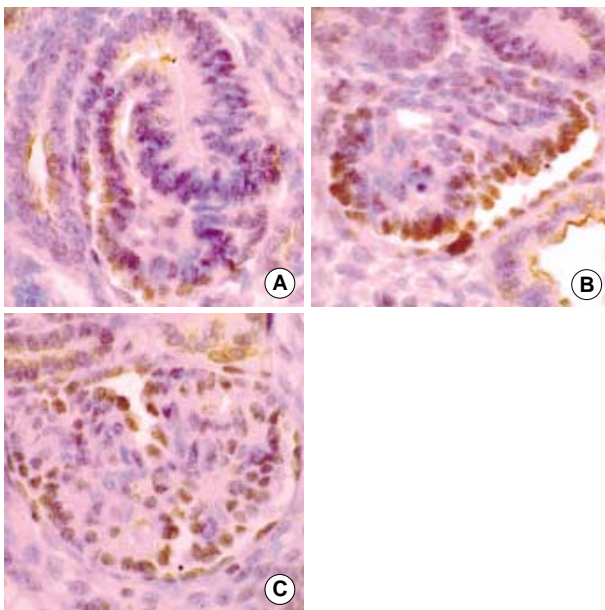


Fig. 2. WT-1 expression in developing glomeruli. (A) In S-shaped body stage, WT-1 is weakly expressed in immature cells. (B) But, it is restricted to glomerular epithelial cells through capillary-loop stage. (C) In mature glomeruli, glomerular epithelial cells show strong nuclear staining of WT-1.

로 그 값이 증가하는 양상을 보였다. FSGS에서 이 수치는 정상과 비교하였을 때 유의한 차이를 보였다($12,355 \pm 2,134$ vs.

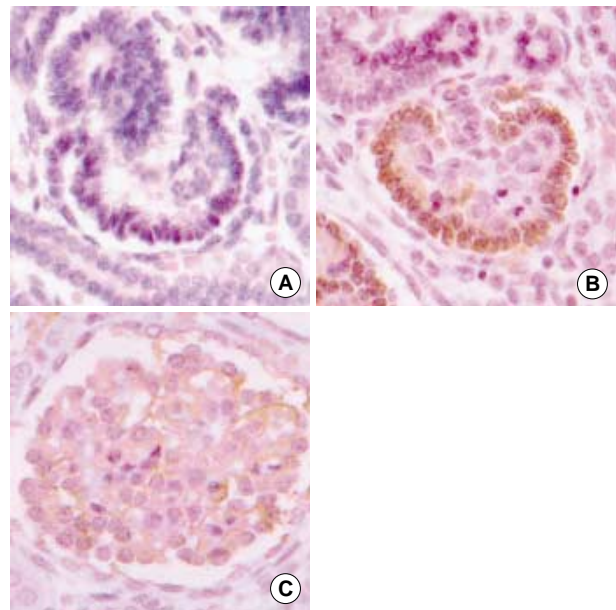


Fig. 3. Nephryn expression in developing glomeruli. (A) No nephryn expression is detected in S-shaped body stage of nephrogenesis. (B) In early capillary-loop stage, nephryn expression is noted at the cell body of podocytes. (C) In mature glomeruli, nephryn expression at cell body is decreased and staining pattern becomes finely linear along capillary wall.

$15,290 \pm 5,936$, $p < 0.05$).

발달 단계에 따른 단백질 발현 양상

GLEPP1은 S-shaped body stage에서부터 발현하기 시작하였다. 이때에는 주로 미성숙 상피세포의 꼭대기쪽 세포막에서 약하게 발현하였다(Fig. 1A). Capillary-loop stage에서는 상피세포의 세포막에서 강하게 발현하였다(Fig. 1B). 성숙한 사구체로 발달이 진행되면서 모세혈관 벽에 연하여 선형으로 강하게 발현하였다(Fig. 1C).

WT-1은 vesicle stage 및 S-shaped body stage에서 미성숙 세포의 핵에서 약하게 발현하였다(Fig. 2A). Capillary-loop stage에서는 신 사구체 상피세포에 국한되어 발현하였다(Fig. 2B). 성숙한 사구체에서는 WT-1이 더욱 강하게 발현하였다(Fig. 2C).

Nephryn은 vesicle stage 및 S-shaped body stage에서는 발현하지 않았다(Fig. 3A). 초기 capillary-loop stage에서 신 사구체 상피세포의 세포 체에서 발현하기 시작하였다(Fig. 3B). Capillary-loop stage의 후반으로 발달이 진행하면서 세포 체에서의 발현은 더욱 증가하였다. 성숙한 사구체가 되면서 세포 체에서의 발현은 급격히 감소하였고, 사구체 모세혈관 벽을 따라 미세한 선형으로 강하게 발현하였다(Fig. 3C).

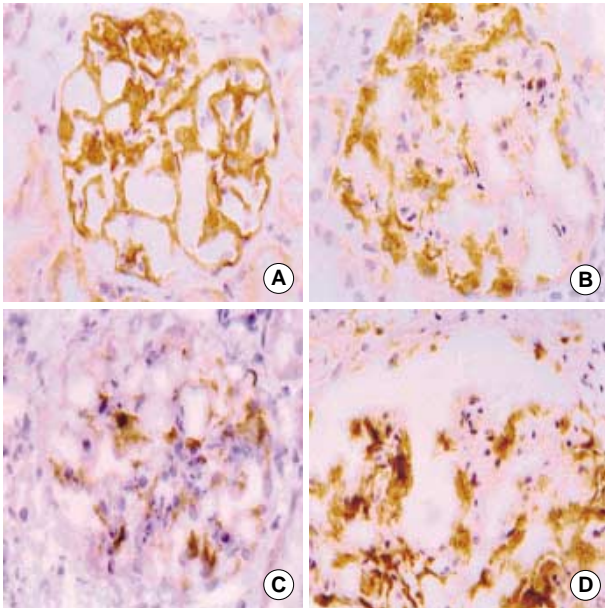


Fig. 4. Glomerular epithelial cell protein-1 (GLEPP1) expression in glomerular disease. (A) Normal glomerulus shows linear staining pattern along capillary wall. (B) A normal-looking glomerulus from the patient with minimal lesion shows focally decreased expression of GLEPP1. (C) GLEPP1 expression is severely decreased in the glomerulus from the patient with focal glomerulosclerosis. (D) A glomerulus from the patient with membranous nephropathy shows focal loss of GLEPP1 staining.

Table 2. Expression of Glomerular epithelial cell protein-1 (GLEPP1), nephrin and WT-1 in glomerular diseases

	GLEPP1	Nephrin	Mean number of WT-1 expressing cells per glomerulus
Control (n=6)	3.0±0.0	3.0±0.0	27.2±3.2
MCD (n=10)	2.2±0.5 ^a	2.7±0.4 ^b	20.0±7.6 ^a
FSGS (n=10)	1.7±0.5 ^a	2.0±0.6 ^a	19.3±3.5 ^a
MN (n=8)	1.8±0.8 ^a	1.7±0.6 ^a	15.9±3.5 ^a

MCD: minimal lesion, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, MN: membranous nephropathy.

Values are mean ± SD.

^ap<0.05 by ANOVA.

^bp<0.05 vs. normal control by Wilcoxon rank sum test.

사구체 질환에서 단백질 발현 양상

GLEPP1은 정상 대조군의 경우 사구체에서 모세혈관 벽을 따라 선형으로 강하게 발현하였다(Fig. 4A). 정상 대조군에서는 GLEPP1의 발현이 국소적으로 감소되거나 소실되는 경우는 관찰되지 않았다. 미소변화형 신증에서는 정상과 동일한 양상으로 발현하는 사구체도 관찰되었으나 GLEPP1의 발현이 국소적으로 감소되거나 소실된 사구체도 관찰되었다(Fig. 4B). 미소변화형 신증 환자에서 관찰한 전체 41개의 사구체 중 23개의 사

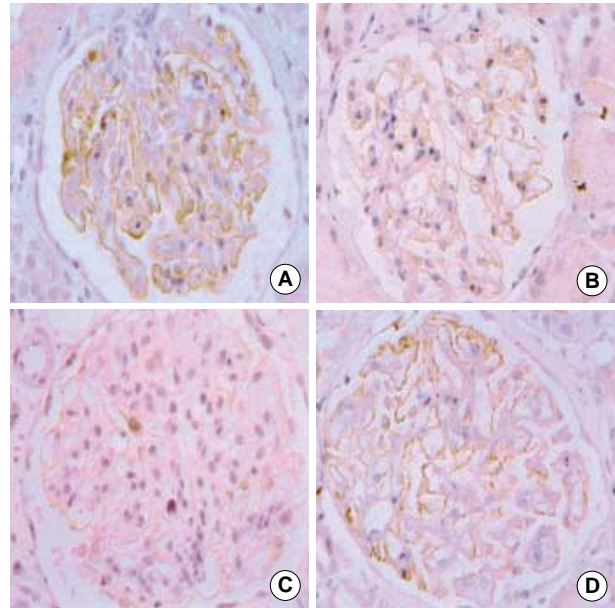


Fig. 5. Nephrin expression in glomerular disease. (A) All the glomeruli from normal control show fine linear staining pattern of nephrin along capillary wall. (B) A histologically normal glomerulus from minimal lesions shows wide decrease and loss of nephrin expression. (C) Nephrin expression is severely decreased in the glomeruli from focal glomerulosclerosis patients showing increased cellularity and narrowing of capillary lumen. (D) In the glomeruli from membranous nephropathy patients, nephrin expression is partly decreased or lost.

구체에서 GLEPP1의 발현이 국소적으로 감소하거나 소실되었으며, GLEPP1 발현 정도를 나타내는 값은 정상 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였다(Table 2, p<0.05). FSGS에서는 GLEPP1이 정상과 동일한 양상으로 발현하는 사구체와 함께 이의 발현이 국소적으로 감소하거나 소실되는 사구체도 관찰되었다(Fig. 4C). 이러한 소견을 보이는 사구체는 FSGS의 경우 총 54개의 사구체 중 46개에 해당하였으며, GLEPP1 발현 정도를 나타내는 값은 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Table 2, p<0.05). 막사구체신염의 경우 GLEPP1의 발현이 감소하는 소견을 총 23개의 사구체 중 18개의 사구체에서 관찰할 수 있었다(Fig. 4D). GLEPP1 발현 정도를 나타내는 값은 막사구체신염에서도 정상 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였다(Table 2, p<0.05). 경화증이 동반된 사구체에서는 경화된 곳으로 갈수록 발현이 감소하다가 완전히 경화된 곳에서는 전혀 발현하지 않았다.

Nephrin은 정상 대조군의 모든 사구체에서 모세혈관 벽을 따라 미세한 선형으로 강하게 발현하였다(Fig. 5A). 정상 대조군의 사구체에서 nephrin의 발현이 감소되거나 소실되는 경우는 관찰되지 않았다. 미소변화형 신증에서는 대부분의 사구체가 정상과 동일한 발현 양상을 보였으나, 총 42개의 사구체 중 14개의 사구체에서 nephrin의 발현이 국소적으로 감소하였다(Fig.

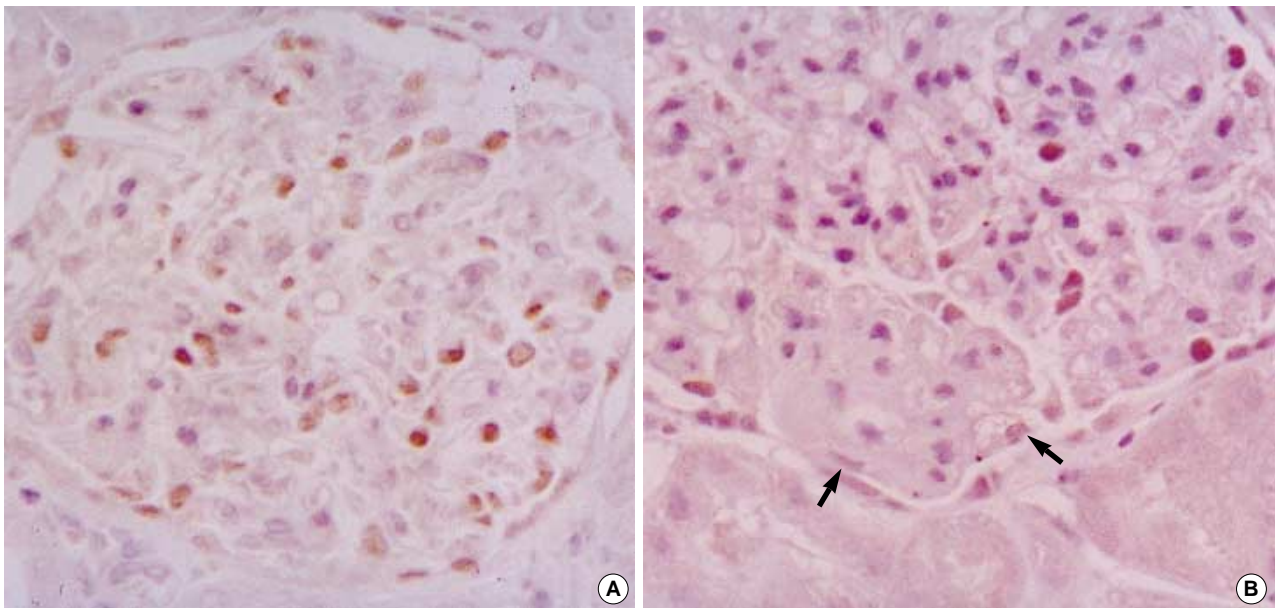


Fig. 6. WT-1 expression in glomerular disease. (A) A glomerulus from control kidney shows strong nuclear staining of WT-1 protein. (B) WT-1 expression is decreased in podocytes adjacent to sclerotic glomerular tuft (arrows) in the glomeruli from patients with focal glomerulosclerosis.

5B). 미소변화형 신증에서 nephrin 발현 정도를 나타내는 값은 정상 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소하였다(Table 2, $p < 0.05$). FSGS에서도 신 사구체 내 nephrin의 발현이 국소적으로 감소하거나 소실된 사구체를 관찰할 수 있었다(Fig. 5C). FSGS에서 이러한 사구체는 전체 49개의 사구체중 40개를 차지하였으며, nephrin 발현 정도를 나타내는 값은 정상 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소한 값을 보였다(Table 2, $p < 0.05$). 막사구체신염에서 신 사구체 내 nephrin의 발현양상이 정상과 동일하게 발현되는 경우는 관찰되지 않았다. 포함된 전체 40개의 사구체 모두에서 nephrin의 발현이 국소적으로 감소되거나 소실되었으며(Fig. 5D), nephrin 발현 정도를 나타내는 값도 정상 대조군과 비교하여 보았을 때 유의하게 작았다 (Table 2, $p < 0.05$). 경화증이 있는 사구체에서 nephrin의 발현 양상은 GLEPP-1과 마찬가지로 경화된 부분으로 갈수록 발현이 감소하다가 경화된 곳에서는 전혀 발현하지 않았다.

WT-1은 정상 대조군의 신 사구체 상피세포의 핵에서 강하게 발현하였다(Fig. 6A). 미소변화형 신증도 정상사구체와 마찬가지로 사구체 상피세포의 핵에서 강한 WT-1의 발현을 확인할 수 있었다. FSGS 및 막성 신증에서 경화증이 동반된 사구체내에서, 정상 사구체의 상피세포핵에서는 WT-1이 발현하지만 경화된 곳으로 갈수록 WT-1의 발현이 감소하였고, 완전히 경화된 부분에서는 WT-1을 발현하는 세포가 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 6B). 사구체 하나당 WT-1을 발현하는 평균 세포수 (mean number of WT1-expressing cells per glomerulus)를 구한 값은 Table 2에 요약되어 있다. 이들 측정된 값은 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염 모두에서 정상 대조군에

비하여 감소하였고 이는 통계적으로 유의하였다(Table 2, $p < 0.05$).

고 찰

본 연구에서 저자들은 신 사구체 발달 단계에서 GLEPP1, WT-1 및 nephrin의 발현 양상을 확인하였고, 대표적인 신증후군성 사구체 질환인 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염에서 이들 단백질의 발현이 정상에 비해 감소하는 사실을 확인하였다.

신 사구체 상피세포는 발달하는 과정에서 형태학적인 변화와 더불어 여러 단백질의 발현 양상의 변화도 함께 보인다. 사구체 발달 단계는 vesicle stage, S-shaped body stage, capillary loop stage 및 mature glomeruli의 넷으로 나눌 수 있다.¹¹ 특히, 사구체가 S-shaped body stage에서 capillary loop stage로 이행될 때 사구체 상피세포는 미성숙한 세포에서 유사분열을 멈추고 특징적인 발달기를 갖는 성숙한 세포로 분화하게 된다. 이러한 발달 과정에서 세포증식능을 나타내는 proliferating cell nuclear antigen과 Ki-67의 발현은 줄어들고 WT-1의 발현은 점점 증가한다.² 또한, podocalyxin, GLEPP-1, ZO-1 단백질과 조혈계 표지자인 CALLA, C3b receptor 등도 S-shaped body stage에서 발현하기 시작하며 상피세포가 분화함에 따라 그 발현이 더욱 증가한다.¹²

신 사구체 발달에 따른 GLEPP1 및 WT-1의 발현 양상은 이전에 보고한 다른 저자들의 결과와 크게 다르지 않다.^{8,9} Nephrin의 경우는 아직 이에 대한 보고가 없었던 바 처음으로

이를 확인하였다. WT-1은 신 사구체가 발달함에 따라 사구체 상피세포에 국한하여 그 발현이 점점 증가하였다. 이는 신 사구체 상피세포의 증식능과 역비례 관계에 있는 바로, WT-1의 기능이 세포주기를 억제한다는 기존의 결과와 잘 부합한다고 생각된다. GLEPP1은 신 사구체 상피세포의 꼭대기쪽 막에서 약하게 발현하기 시작하였다. 이후 capillary-loop stage와 mature glomeruli를 거치면서 세포 체(cell body)에서뿐만 아니라, 발달기 쪽으로 그 발현이 이동하여 모세혈관 벽을 따라 선형으로 강하게 발현하였다. Nephrin은 초기 capillary stage에서 사구체 상피세포의 꼭대기쪽 막 및 기저막에서 강하게 발현하다가 후기로 진행하면서 모세혈관 벽에 연하여 아주 미세한 선형으로 발현하였는데 이는 GLEPP1의 발현 양상과 유사하다. 즉, 이들 단백질은 발달기의 발달과 더불어 발현이 증가함과 동시에 발달기 쪽으로 이동하였다. 따라서, GLEPP1과 nephrin은 신 사구체 상피세포의 발달기의 발달과 매우 밀접한 연관이 있을 것으로 생각된다. 한편, nephrin도 성숙한 상피세포로 분화함에 따라 발현한다는 점에서 GLEPP1, WT-1과 마찬가지로 성숙표현형을 나타내는 생화학적 지표로 볼 수 있겠다.

사구체 질환 중에서 GLEPP1, WT-1 등의 성숙형을 나타내는 지표들의 감소는 HIV-associated nephropathy와 collapsing FSGS에서 보고된 바가 있다.⁹ 이들 연구 결과에 의하면, 실험군에 포함된 미소변화형 신증, 막사구체신염의 경우 GLEPP1과 WT-1은 정상과 동일한 양상으로 발현한다고 보고하였다. 그러나 이들 저자들은 사구체에서 성숙형을 나타내는 지표들의 발현 양상을, 전혀 발현하지 않는 경우와 정상과 동일하게 발현하는 두 유형으로만 구분하였다. 그러나 Sharif 등⁸은 FSGS의 경우에도 GLEPP1이 세포 체(cell body) 쪽으로 이동하는 양상과 더불어 국소적으로 발현이 소실된다는 결과를 보고한 바가 있어, 본 저자들은 보다 많은 사구체를 대상으로 개개의 사구체 상피세포에서 이들 단백질 발현의 미소한 차이를 자세하게 관찰해 볼 필요성을 느꼈다. 그 결과, 본 연구에서 저자들은 미소변화형 신증에서도 정상에 비해 발현이 감소하는 경우를 확인할 수 있었으며, FSGS 및 막사구체신염에서는 국소적으로 소실되는 경우도 관찰하였다. WT-1의 경우도 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염 모두에서 발현하기는 하였지만, 사구체 하나당 WT-1을 발현하는 세포의 수를 산출하였을 때에는 정상에 비해 이 모든 경우에서 그 값이 감소하는 사실을 확인하였다.

후천적으로 발생하는 신증후군성 사구체 질환에서 아직 nephrin의 발현에 대해서는 연구된 결과가 없었으나 본 저자들이 이를 처음으로 확인하였다. 정상 대조군의 경우 nephrin의 발현이 감소한 사구체는 관찰되지 않았다. 그러나 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염 모두에서 국소적으로 nephrin의 발현이 감소하거나 소실된 사구체가 관찰되었다. 질환 간에 이러한 소견을 동반하는 사구체의 비율에 약간의 차이는 있지만, 이들 질환 모두 nephrin 발현 정도를 나타내는 값은 정상 대조군과 비교해 보았을 때 유의하게 감소하였다.

Furness 등¹⁰이 사람에서 채취한 단일 신 사구체를 대상으로 nephrin mRNA의 발현을 역전사중합반응과 ELISA법으로 확인한 결과 정상에 비해 미소변화형 신증에서 nephrin mRNA의 발현이 현저하게 감소하였고, 막사구체신염의 경우는 정상과 비슷한 정도로 발현하는 것을 보고하였다. 그러나 본 저자들이 면역조직화학적 방법으로 확인해 본 결과 막성 신증의 경우에도 상당수의 사구체에서 nephrin의 발현이 감소함을 확인하였다. Furness 등의 실험에는 한 명의 막성 신증 환자를 대상으로 하였으며, 또한 이 환자에서 시행한 생검조직에서 오직 한 개의 신 사구체만을 선택한 반면, 본 저자들은 8명의 환자에서 약 40개의 신 사구체를 대상으로 하였으므로 본 저자들의 결과가 통계적인 면에서 더 신뢰성이 있다고 판단된다. 또한, 본 저자들은 면역조직화학적 검사방법으로 단백질 발현을 관찰한 것이나, 이들 저자들은 역전사중합반응에 의해 mRNA의 발현을 본 것이므로, 이러한 방법상의 차이에 의해서도 다른 결과를 보일 수 있다고 생각된다.

사람에게서 심한 단백뇨를 유발하는 질환들은 신 사구체 상피세포의 발달기가 광범위하게 소실되고 일부의 경우에는 기저막에서 탈락되는 등의 소견을 공통적으로 보이며, 이러한 변화는 동물을 대상으로 한 aminonucleoside 신증 모델에서도 관찰된다.^{13,14} 이는 사구체 상피세포의 정교한 구조가 사구체의 선택적 투과성을 유지하는 데 중요한 역할을 하고 있음을 입증한다. 그러나 신증후군을 초래하는 다양한 신 사구체 질환에서 상피세포의 형태학적 변화가 나타나는 기전에 대해서는 아직까지 명확하게 알려진 바가 없다. 일부의 연구자들은 신 사구체 상피세포의 탈분화(dedifferentiation)에 의해 이들 질환이 발생한다는 가설을 제시하고 있다.⁸ 그 근거로는, 신증후군을 일으키는 질환에서 관찰되는 신 사구체 상피세포의 전자현미경적 특징이 미성숙 상피세포와 흡사한 소견을 보이며,¹¹ 이러한 사구체 질환에서 GLEPP1의 발현 양상도 미성숙 상피세포와 흡사한 양상을 보이기 때문이다.⁸ 또한, FSGS에서 드물지만 사구체 상피세포의 유사분열이 관찰되었다는 보고도 이를 지지하는 것으로 생각된다.¹⁵ 한편, 원발성 collapsing FSGS와 HIV-AN의 경우에도 상피세포의 발달기 소실과 더불어서 유사분열이 비교적 빈번히 관찰되며, 이른바 성숙형을 나타내는 지표들인 GLEPP1, WT-1, podocalyxin 등의 발현이 현격히 감소하거나 소실되며 Ki-67이 재발현한다.⁹ 한편, 저자들은 본 연구에 포함된 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염의 경우도, 비록 HIV-associated nephropathy와 원발성 collapsing FSGS의 경우처럼 현격하지는 않더라도, 성숙형의 지표들이 동일하게 감소함을 확인하였다. 비록 현재까지 이들 사구체 질환을 일으키는 요인이 분명히 밝혀진 것은 아니지만, 여러 요인들로 인해 상피세포가 손상을 입고 변성되면서 보이는 일련의 형태학적 변화와 생화학적 지표들의 변화가 위에서 열거한 질환들에 유사하게 나타나는 점으로 미루어 볼 때, 이들 모든 신증후군을 초래하는 질환의 발생에는 공통된 병태생리적 기전이 작용하는 것으로 생각된다.

그렇다면 이들 단백질의 발현에 변화가 생기는 것이 신 사구체 상피세포의 기능과 구조와는 직접적으로 어떠한 연관이 있는가에 대해 의문이 제기될 것이다. Topham 등¹⁶은 사람의 사구체 상피세포를 대상으로 한 실험에서 세포골격과 국소 접착(focal adhesion)을 유지하는 데 황화(phosphorylation)와 탈황화(dephosphorylation)의 균형이 중요함을 밝힌 바 있다. GLEPP1은 염기서열분석 결과 세포질 내의 부분이 tyrosine phosphatase 기능을 할 것으로 생각된다.^{3,17} 또한, 분리된 토끼와 쥐의 사구체에 GLEPP1의 세포막 밖의 부분을 인지하는 항체를 처리하였을 때 단백질의 유출이 유발된다는 보고도 있어, 이 단백질이 세포내 신호전달체계에 영향을 미칠 것으로 생각된다.¹⁸ 따라서, 여러 병적 상태에서 GLEPP-1의 발현이 감소하게 되면 발돌기의 구조를 유지하는 분자의 황화상태에 영향을 주게 되어 형태학적 변화를 초래할 것으로 생각된다. 그러나, GLEPP1이 세포내 분자들의 황화상태에 직접 영향을 줄 수 있는지에 대해서는 아직 실험적인 증거들이 불충분하다.

한편, Nephrin은 여덟 개의 Ig-like motive, 한 개의 fibronectin type III-like domain, transmembrane domain과 intracellular domain으로 구성된다.⁵ 세포막 밖에 있는 여덟 개의 Ig motive는 인접한 nephrin의 동일 부분과 서로 접착하여 틈새막 사이에서 발돌기와 발돌기를 부착시키는 접착분자로서의 기능을 담당할 것으로 추측된다. 따라서, nephrin이 사구체 상피세포에서 여러 요인에 의해 감소하게 되면 발돌기 사이의 접착력이 떨어지게 되고 발돌기가 소실되며, 그 결과 단백뇨를 초래하게 될 것으로 생각된다. 그러나 nephrin이 실제로 접착분자로 기능을 하는지 아직 실험적으로 입증되지 않았다.

사구체 상피세포를 포함하여 완전히 분화된 세포에서 세포의 증식과 분화는, 잘 알려진 바와 같이 상호 배타적 관계에 있다. 근 조직 분화과정에서 MyoD는 p21의 전사를 통해 세포 증식을 억제하고 근 세포 내에 여러 단백질의 합성을 유도하여, 근 세포의 형태학적 및 생화학적 분화를 유도한다. 한편 Englert 등⁷은 골육종기원의 세포주를 통한 실험에서 WT-1에 의해 p21 단백질이 유도됨을 입증한 바 있다. 따라서, 여러 요인에 의해 손상 받은 신 사구체 상피세포에서 WT-1이 하향조절(down regulation)되면 억제되어 있던 세포증식능이 재발현하고, 성숙한 상피세포에서 발현하는 단백질에 중대한 변화가 오게 될 것이다. 그러나 위에서 약술한 기전들이 신 사구체 상피세포에서도 동일하게 작용하는지를 입증하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

요약하면, 신 사구체 상피세포의 발돌기와 틈새막으로 이루어지는 정교한 구조는 신 사구체의 선택적 투과성을 유지하는 데 중요한 구성요소이다. 상피세포는 발달 과정을 통해 이러한 구조를 획득하게 된다. 상피세포는 성숙한 세포로 분화함에 따라 형태학적 분화와 더불어서, GLEPP1, WT-1 및 nephrin 등의 발현 등 생화학적 분화가 동반하여 나타난다. 따라서, 이들 단백질은 신 사구체 상피세포의 분화를 유도하고 성숙한 상태를 유지

하는 데 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다. 한편, 심한 단백뇨를 초래하는 신 사구체질환에서는 공통적으로 발돌기 소실과 상피세포의 탈락 등이 빈번히 관찰되는 바, 신 사구체 상피세포의 손상으로 인한 형태학적 변화가 이들 질환에 있어서 중요한 병태생리적 기전으로 작용함을 알 수 있다. 본 연구에 포함된 미소변화형 신증, FSGS 및 막사구체신염은 모두 심한 단백뇨를 초래하는 대표적 신 사구체 질환으로 이들 질환에서 상피세포의 형태학적 변화가 관찰됨과 동시에 성숙형을 나타내는 GLEPP1, WT-1 및 nephrin의 발현이 정상에 비해 감소하였다. 그리고 이러한 지표의 변화는 질환들 간의 차이에도 불구하고 공통적으로 관찰되었다. 따라서, 단백뇨를 초래하는 이들 신 사구체 질환의 발생에는 공통된 병태생리적 기전이 작용할 것으로 생각되며, 또한 이들 지표의 감소가 이러한 과정에서 중요한 역할을 담당할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol* 1995; 192: 385-97.
- Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993; 119: 1329-41.
- Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein tyrosine phosphatase: Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J Biol Chem* 1980; 169: 19953-62.
- Kestilae M, Lenkkeri U, Maennikkoe M, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephtrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-82.
- Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartivaara J, *et al.* Nephtrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962-7.
- Mundel P, Reiser J, Kriz W. Introduction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 697-705.
- Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Harber DA. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1997; 57: 1429-34.
- Sharif K, Goyal M, Kershaw D, Kunkel R, Wiggins R. Podocyte phenotype as defined by expression and distribution of GLEPP-1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF and FSGS. *Exp Nephrol* 1998; 6: 234-44.
- Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Aggati V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of col-

- lapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 51-61.
10. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1234-7.
 11. Reeves W, Caulfield JP, Farquhar MG. Differentiation of epithelial foot process and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 1978; 39: 90-100.
 12. Platt JL, Tucker WL, Michael AF. Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohematopoietic differentiation antigens. *J Exp Med* 1983; 157: 155-72.
 13. 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.
 14. Arakawa M. A scanning electron microscopic study of the human glomerulus. *Am J Pathol* 1971; 64: 457-66.
 15. Nagata M, Yamaguchi Y, Komatsu Y, Ito K. Podocytes in diseased human kidney. *Nephron* 1995; 70: 68-71.
 16. Topham PS, Haydar SA, Kuphal R, Lightfoot JD, Salat DJ. Complement-mediated injury reversibly disrupts glomerular epithelial cell actin filaments and focal adhesions. *Kidney Int* 1999; 55: 1763-75.
 17. Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: Characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-13. *Genomics* 1995; 27: 174-81.
 18. Charba D, Sharma R, McCarthy ET, Goyal M, Wiggins RC, Savin VJ. Antibodies to GLEPP1 increase albumin permeability of rabbit or rat glomeruli in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1729-35.