

Puromycin Aminonucleoside 투여로 인한 사구체 기저막 및 상피세포의 변화

계명대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

최찬오 · 김현철 · 박관규*

〈요약〉

저자는 Sprague-Dawley 흰쥐 35 마리를 대상으로 puromycin aminonucleoside(PAN)를 복강 내에 주사하여 신 손상을 일으킨 후 사구체 상피세포의 변화, 기저막의 음이온부위의 변화와 단백뇨와의 관계 및 죽세포의 재생여부를 관찰하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

PAN 투여 3일 및 7일째 부터 1일 요 단백이 증가하기 시작하여 10일째 $293 \pm 44\text{mg}$ 으로 최대로 증가하였다. PAN 투여 후 초미형태학적 변화로는 죽양돌기의 융합, 리소솜의 증가, 미세융모성 변화 등이 3일째 부터 관찰되었으며 이러한 소견들은 16일째 부터 회복되기 시작하여 20일째에는 대체로 정상과 비슷하게 되었다. Polyethyleneimine을 이용한 음이온부위의 관찰을 통해 실험군에서 죽세포의 융합 자체는 기저막내의 음이온을 소실시키지 않았다. 그러나 죽세포가 융합된 부위의 기저막 일부에서 음이온이 불규칙하게 존재하는 경우가 있었으며 죽세포가 탈락된 곳의 기저막에는 음이온이 소실되었다. 융합된 죽세포가 복구되면 기저막의 음이온의 구조도 정상 상태로 회복되었다. 상피세포의 표면에도 음이온이 존재하며 그 변화는 기저막의 음이온 변화와 유사하였다. PCNA 양성세포 수는 대조군에서 1.06개, PAN 투여군에서는 투여 7일째 평균 3.09개로 유의하게 증가하였다($P<0.05$). PCNA 양성세포는 대부분 상피세포였고 그 수는 PAN 투여후 증가하였으며 그것은 상피세포의 증식이 있음을 시사하는 소견의 하나로 생각되었다.

다만 형태학적으로는 음이온 부위가 회복되었으나 단백뇨는 어느정도 지속되었는데 과연 전자현미경으로 관찰되지 않는 틈이 있는지 혹은 형태학적으로는 회복된 전하장벽이 기능적으로는 역할을 충분히 못하는지의 여부 등을 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

서 론

Puromycin aminonucleoside(PAN) 투여후 초래되는 사구체 신질환은 1955년 Frenk 등¹⁾이 처음 보고한 이래 신증후군의 실험적 모델로서 널리 이용되고 있다. 그러나 PAN에 의해 초래되는 단백뇨의 정확한 발생기전에 관해서는 아직도 잘 밝혀져 있지 않으며 단지 사구체 상피세포가 주된 손상부위라고 추정되고 있다^{2~5)}. 이러한 상피세포의 변화는 단백뇨에 대한 이차적인 반응이라는 주장과⁶⁾ PAN의 상피세포

의 직접 독성에 의해 공포화 변성 등이 일어난다는 설이 제기되었다⁷⁾. 단백뇨는 세뇨관에서의 단백 재흡수장애⁸⁾ 및 사구체 기저막에서의 음이온 부위의 변화에 의해 발생됨이 알려지고 있다^{9~12)}.

사구체에서의 음이온부위는 양이온 색소중 하나인 polyethyleneimine(PEI)을 사용하여 초미세구조를 관찰함으로써 알 수 있다. Kanwar 등¹³⁾과 Rosenzweig 등¹⁴⁾은 동물실험에서 양이온 물질을 투여하여 사구체 기저막의 전하를 중성화시키거나, 효소 소화로 heparan sulfate를 제거하면 알부민 등의 음전하를 띤 혈장내 단백질이 사구체기저막을 쉽게 통과함을 관찰하고 단백뇨와 음이온부위 소실과의 상관관계를 밝힌 바 있다.

책임저자 : 박관규 대구광역시 중구 동산동 194

계명대학교 의과대학 병리학교실

Tel : 053)250-7465, Fax : 053)250-7852

PAN 투여시 주된 손상 부위는 상피세포로 알려져 있고 또한 족세포 손상시의 변화에 대해서도 많은 보고가 있으나 재생 및 증식에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 인간의 사구체 신질환 때 사구체 간질세포와 내피세포의 손상과 재생에 관한 문헌은 있으나¹⁵⁾ 족세포가 주된 표적인 여러 신질환에서도 신손상 후 족세포의 증식은 임상적 혹은 실험적 사구체질환 어느 곳에서도 관찰되지 않는다. 그것은 족세포는 뇌세포 처럼 고도로 분화된 세포로서 세포증식이나 손상 후의 세포분열 등이 극히 제한되어 있기 때문이다. 그러나 사구체 손상 때 사구체 간질세포 및 내피세포도 손상과 함께 증식이 일어날 수 있듯이 족세포 또한 상해와 더불어 증식이 일어날 가능성은 상상할 수 있다. 최근 Floege 등¹⁵⁾은 족세포 증식의 가능성을 제시하였고 Yamazaki⁵⁾도 세포증식의 지표로 사용되는 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)염색을 통해 족세포의 재생 가능성을 보고하였다. 이러한 문헌들은 지금까지의 생각과는 달리 족세포도 증식될 수 있다는 가능성을 제시한 것이다.

저자는 이러한 문헌적 지식을 바탕으로 신손상 후 족세포의 증식여부를 관찰해 보기 위하여 지금까지 잘 알려진 신증 유발약제인 PAN을 사용하여 족세포의 손상을 초래한 뒤 그 재생 여부를 살펴보고 또한 손상되는 과정에서 발생하는 사구체 상피세포의 변화 및 기저막내의 음이온 부위 변화와 단백뇨와의 상관관계를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물로는 생후 약 8주된 체중 250g 내외의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험군으로는 28마리의 흰쥐에 체중 100g 당 PAN(Sigma, USA) 15mg을 복강내 1회 주사하였으며 대조군으로는 7마리의 흰쥐에 동량의 생리식염수를 복강내 주사하였다. 24시간 요단백과 소변량은 1일째부터 20일째까지 매일 측정하였으며 요단백검사는 sulfosalicylic acid precipitation 방법¹⁶⁾을 사용하였다. 형태학적 검색을 위해 PAN 투여 후 1, 3, 7, 10, 13, 16 및 20일째 각각 4 마리씩 선택하여 에테르 마취하에 복부를 절개한 다음 신장을 적출하였다.

1. 광학현미경적 관찰 및 PCNA에 대한 면역조직화학염색

적출된 신장조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 2-4 μm의 박절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin과 필요에 따라 Masson씨 trichrome, periodic acid-Schiff 및 silver 염색을 하였다. PCNA 발현을 보기 위한 면역조직화학염색을 위한 일차항체로 PCNA(monoclonal antibody PC10, Novoceastra Lab, UK)를 1:500으로 회석하여 사용하였다. 포르말린 용액으로 고정하고 파라핀 포매된 신장조직을 4 μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 탈파라핀과 탈수를 시행한 후 계열 에탄올을 거쳐 함수하고 메탄올과 30% H₂O₂를 9:1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 0.01M citrate buffer(pH 6.0) 용액에 담근 뒤 5분씩 2회 가열하였다. 그후 30 μl의 일차항체를 조직절편 위에 놓고 유리를 덮은 다음 37 °C에서 2시간 두었다. 세척 후 이차항체(biotinylated anti-mouse, anti-rat and anti-goat immunoglobulins, DAKO LSAB, USA)와 Streptavidine peroxidase conjugated(DAKO, USA)를 조직절편 위에 적당량 놓은 후 각각 실온에서 20분간 반응하였다. 세척은 phosphate buffered saline(PBS)을 사용하였으며 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 용액으로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2. 주사전자현미경적 관찰

주사전자현미경적 관찰을 위한 신장조직은 1×1×4mm 정도 크기로 자른 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 할단면 관찰을 위하여 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde 혼합고정액에 고정한 후 PBS로 세척한 다음 1% OsO₄에 2시간 후 고정을 하고 다시 PBS로 세척하였다. 세척된 조직은 25% DMSO에 30분간, 50% DMSO에 30분간 담근 다음 액체질소로 동결하여 조직을 할단하였다. 할단된 조직을 50% DMSO에 녹여서 다시 같은 PBS로 세척하여 2% tannic acid에 12시간 침투시킨 다음 1% OsO₄로 2시간 동안 전도염색(conductive staining)한 후 알코올로 탈수하고 isoamyl acetate로 침투를 시켜 임계점 건조를 하였다. 건조된 시료를

시료판에 부착한 후 Eiko 회사 IB-3 형 이온 증착기 (ion coater)를 사용하여 pt-pd 합금으로 증착한 다음 Hitachi S-520형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

3. 투과전자현미경적 관찰

투과전자현미경용으로 제공된 신장조직 절편을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액 (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전 고정을 하고 0.1M PBS로 세척한 후 1% OsO₄용액에 2시간 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척하여 계열에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열증합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여 toluidine blue염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

4. 음이온 부위관찰

Okada 등¹⁷⁾의 방법에 따라 0.5mm³로 세절된 신장조직을 1~4°C에서 8.5% sucrose를 포함하는 0.5% polyethyleneimine(PEI) 용액(Sigma, U.S.A., pH 7.4)에 30분간 담근 후 역시 8.5% sucrose를 함유하는 0.1M cacodylate 완충용액(pH 7.4)에 10분 간격으로 3회 세척하고 8.5% sucrose를 함유하는

2% phosphotungstic acid-0.1% glutaraldehyde 혼합액(pH 7.4)에 1시간 동안 담근 다음 다시 0.1M cacodylate 완충용액에 10분간 씩 3회 세척하였다. 다음에 실온에서 0.1M cacodylate 완충용액으로 만든 2% OsO₄용액에 2시간 후고정시킨 후 계열에탄올로 탈수시키고 epon 혼합물에 포매한 후 투과전자현미경적 관찰을 위한 통상적인 과정을 거쳐 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시한 후 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 24시간 소변량 및 요단백 변화

대조군 환자의 24시간 소변량은 평균 12.23±2.67 ml였으며 실험군에서는 1일째부터 약간씩 감소하기 시작하여 3일째 4.89±1.21ml로 최저치에 도달한 후 다시 증가하기 시작하여 10일째 20.25±3.24ml로 최고로 증가하였다. 20일째에는 14.5±3.35ml로 대조군과 비슷하게 되었다. 24시간 요단백은 대조군은 11.0 ±2.7mg이었으며 실험군에서는 3일 및 7일째부터 증가하기 시작하여 10일째 293.0±43.9mg으로 최고치에 달한 후 다시 약간씩 감소하여 20일째에는 146.0±30.7mg를 나타내었다(Table1).

2. PCNA 면역조직화학염색 소견

PCNA에 염색된 신장조직은 광학현미경의 400배 시야로 관찰하여 핵에 진한 갈색의 파립이 있을 때 PCNA 양성 발현세포로 판독하였으며 사구체 30개에서 양성세포의 수를 세어 평균을 내었다. PCNA 염

Table 1. Changes of Urine Volume, Urinary Protein Excretion and the Number of PCNA Positive Cells in Puromycin Aminonucleoside Induced Nephritis

	Urine volume (ml/day)	Urinary protein excretion (mg/day)	PCNA positive cells (per glomerulus)
Control(n=7)	12.23±2.67	11.0±2.7	1.06±0.32
Experimental			
Day 1(n=4)	10.88±2.61	8.0±1.4	1.34±0.58
3(n=4)	4.89±1.21*	18.0±3.7*	1.18±0.51
7(n=4)	17.00±4.42	192.0±53.7*	3.09±0.46*
10(n=4)	20.25±3.24*	293.0±43.9*	1.29±0.54
13(n=4)	14.30±3.01	185.0±24.1*	1.31±0.51
16(n=4)	17.85±4.25	211.0±40.1*	1.89±0.27*
20(n=4)	14.50±3.35	146.0±30.7*	3.33±0.39*

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen, * : P<0.05 compared with control

Fig. 1. Immunostainings for PCNA. (a) Control rat, No PCNA positive cells are seen in the glomerulus($\times 200$). (b) day 3, PCNA positive cell is found outside the capillary loop and parietal epithelial cell($\times 200$). (c) day 5, three or four PCNA positive cells are found($\times 200$). (d) day 20, there are numerous PCNA positive cells in the glomerulus ($\times 200$).

색에 양성 세포들은 대부분 사구체 모세혈관 바깥쪽의 족세포로 생각되어지는 부위에서 염색되었다(Fig.

1). PCNA 양성세포의 수는 대조군에서는 평균 1.06 ± 0.32 개 염색되었으며 실험군에서는 7일째에 3.09 ± 0.46 개, 16일째에 1.89 ± 0.27 개 및 20일째 3.33 ± 0.39 개로 대조군에 비해 유의하게 증가되었다($P < 0.05$) (Table 1).

3. 투과 및 주사전자현미경적 소견

실험군에서 1일째 대조군(Fig. 2, 4)에 비해 족세포의 세포질에 경한 부종성 변화만 있었고 족양돌기(foot process)의 융합은 관찰되지 않았다. 3 일째에는 족세포의 족양돌기의 융합은 그다지 심하지 않았으나 족세포의 세포질에 리소솜의 증가가 관찰되었고 (Fig. 5) 일부에서 미세융모 및 미세필라멘트가 관찰

Fig. 2. Scanning electron micrograph of glomerulus in control rat. Glomerular capillaries are cut in various directions. The nuclear portions of endothelial cells occasionally bulge into the capillary lumen. On the outside of the capillary wall the round cell bodies of podocytes (p) and their processes are attached($\times 2,300$).

Fig. 3. Scanning electron micrograph of glomerulus in experimental rat on day 16. The capillary walls are covered by fused podocytes (p) which show fibrillar structures on the outer surface (arrows)($\times 27,500$).

Fig. 4. Transmission electron micrograph of glomerulus in control rat. The basement membrane and covering foot processes are well preserved($\times 28,900$).

Fig. 5. Experimental rat on day 3. There are increased numbers of lysosomes (Ly) in the cytoplasm of the podocyte($\times 13,600$).

되기도 하였다. 7일, 10일 및 13일째에도 유사한 소견을 보였으며 족양돌기가 심하게 융합되었고 리소솜의 증가 및 세포질의 공포화 현상도 관찰되었다(Fig. 6-8, 10). 그리고 일부 상피세포의 족양돌기는 기저막으로부터 탈락되었다. 16일째에 족양돌기는 역시 융합되어 있었고 세포질에 공포화현상 및 미세융모성 변화도 관찰되었으나(Fig. 3, 11) 13일째의 변화에 비해 경한 편이었으며 일부에서는 모세혈관에 족양돌기의 반은 융합되었고 반은 재생된 것으로 보이는 소견도 관찰되었다(Fig. 9). 20일째에는 일부에서 리소솜은 약간 남아 있었으나 대부분은 재생되어 정상과 유사한 소견을 보였다.

4. 음이온 부위의 변화 소견

대조군에서의 음이온 부위는 주로 기저막을 따라 분포하였는데 기저막 중에서도 기저막 외측판(lamina rara externa)에는 PEI 입자의 크기가 비교적 크며 규칙적으로 분포하였고, 기저막 내측판(lamina rara interna)에는 입자의 크기는 기저막 외측판의 그것과 비슷하나 불규칙적으로 분포하였다(Fig. 12). 족세포의 표면에도 세포막을 따라 PEI 입자가 존재하였다. 실험군에서 1일째 거의 모든 예에서 족세포 및 기저막에 음이온이 존재하였고 모양도 대조군과 거의 비슷하였다(Fig. 13). 3일째에는 족세포가 융합된 부위

Fig. 6. Experimental rat on day 7. The foot processes are markedly fused($\times 17,000$).

Fig. 7. Experimental rat on day 7. Large cystic vacuoles(V) are seen in the cytoplasm of the podocyte($\times 10,200$).

Fig. 8. Experimental rat on day 10. The cytoplasm of the podocyte shows villous formation($\times 13,600$).

Fig. 9. Experimental rat on day 16. Half of the foot processes in the capillary are recovered($\times 8,500$).

— Chan Oh Choi, et al : Morphological Changes in Glomerular Epithelial Cells and Basement Membranes in Puromycin Aminonucleoside Induced Nephropathy —

의 일부에서 음이온 부위가 불규칙하게 분포하거나 일부 소실되어 있었다(Fig. 14, 15). 그러나 대부분의 족세포가 융합된 부위나 미세필라멘트가 있는 부위의 기저막에는 음이온 부위의 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 16, 17). 이 경우 족세포 표면의 음이온 부위도 존재하고 있었다. 7일째에는 음이온 부위는 대부분 3 일째의 소견과 유사하였으나 일부 족세포가 기저막으로부터 박리된 곳에는 음이온이 소실되어 있었다 (Fig. 18). 10일 및 13일째의 음이온부위의 변화도 7 일째의 소견과 유사하였다. 16일째의 음이온 부위의

변화는 그전과 유사하였으나 단지 족세포가 기저막으로부터 탈락된 곳이 관찰되었으나 심하지는 않았다. 20일째의 음이온 부위는 대부분 정상과 유사하게 관찰되었다(Fig. 19).

고 찰

Puromycin aminonucleoside(PAN)에 의해 유발되는 사구체 질환의 모델은 사람의 미소변화형 신증후군이나 초점성 분절형 사구체경화증과 매우 유사한

Fig. 10. Experimental rat on day 16. The podocytes (p) show foot process fusion and numerous fibrillar structures(arrows)($\times 5,100$).

Fig. 11. Experimental rat on day 16. Fine fibrillary structures of the podocytes are irregularly bridged($\times 5,100$).

Fig. 12. Control rat incubated in PEI. There are regular array of anionic sites(arrow) in the lamina rara externa($\times 14,420$).

Fig. 13. Experimental rat on day 1. The anionic sites(arrows) of the basement membrane and epithelial surface are relatively well preserved($\times 28,900$)

것으로 알려져 있다²⁾. PAN 유발 신염에서 관찰되는 족세포 변화의 기전은 다른 실험적 모델, 즉 passive Heyman nephritis(PHN)와 같은 면역복합체 침착에 의한 손상이 아닌 족세포의 직접손상으로 알려져 있다. PAN에 의해 초래되는 단백뇨는 족세포 손상으로 인한 기저막의 투과성 항진에 의한 것으로 추측되고 있으나⁶⁾ 과연 어떠한 병리형태학적 기전으로 인해 단백뇨가 초래되는지에 대해서는 아직도 명확히 밝혀져 있지 않다. 형태학적으로 잘 알려진 가장 현저한 변화는 상피세포에서 발생하며 특히 족양돌기의 융합과

족세포의 세포질내 공포형성이 특징적인 것으로 알려져 있다⁷⁾. 본실험에서도 이러한 소견들이 잘 관찰되었다. PAN 투여후 초래되는 단백뇨 및 상피세포의 변화에 관해 과거에는 단백뇨에 의해 이차적으로 족세포의 손상이 온다고도 여겨졌으나, Ryan 등²⁾이 단백뇨가 발생되기 이전에 족양돌기의 융합 혹은 소설이 광범위하게 먼저 일어남을 보고한 이래 단백뇨는 족세포의 직접 손상으로 인해 이차적으로 발생된다고 믿어지게 되었다.

Pore 가설이 Poppenheimer¹⁸⁾에 의해 처음 정립

Fig. 14. Experimental rat on day 10. There is focal disarray of anionic sites(arrow heads) in the basement membrane under the fused foot processes($\times 25,500$).

Fig. 15. Experimental rat on day 13. There is focal loss of anionic sites(arrow heads) in the basement membrane under the fused foot processes($\times 28,900$).

Fig. 16. Experimental rat on day 7. The anionic sites(arrows) of the basement membrane in the lamina rara externa and epithelial surface are not changed. The podocyte shows increased numbers of lysosomes(Ly)($\times 25,500$).

Fig. 17. Experimental rat on day 3. The anionic sites(arrows) of the basement membrane under the microfilaments(Mf) are not changed($\times 28,900$).

된 이래 음전하의 변화가 단백뇨 발생에 어떤 역할을 할 것이라고 생각되어 왔으며 이것에 관한 많은 실험적 시도가 있었다^{9, 12, 19, 20)}. 그러나 이러한 음전하의 변화에 관한 연구들은 모두 그 결과가 일정하지 않았다. 그것은 염색된 음이온 부위의 정량적 분석의 어려움과 실험에 사용된 양이온 소식자의 특성 차이에 기인하는 것으로 생각된다²¹⁾. 신장에서 음이온 부위를 염색하기 위한 소식자로는 PEI, Ruthenium red, Alcian blue, Safranin-O, Cuprolinic blue 등이 사용되고 있으며 이들 소식자들은 염색된 음이온 부위의 형태가 각각 다르게 나타나며, 소식자 자체가 초

미세구조에 손상을 일으켜 음이온의 형태학적 구조에 영향을 미칠 수도 있다. 본 실험에서 양이온 소식자로 사용된 PEI는 비록 많이 사용하더라도 전하장벽이나 초미세구조에 영향을 적게 미치는 것으로 알려져 있어서²²⁾ 현재 많이 사용되고 있다. 사구체 기저막의 고정 음이온 전하는 heparan sulfate proteoglycan으로 구성되어 있으며 이것은 음이온을 떤 혈청단백에 대해서 중요한 전하장벽으로 작용한다^{13, 23)}. Hiramatsu 등²⁴⁾은 생쥐의 사구체 기저막에서의 heparan sulfate proteoglycan의 위치는 PEI 염색방법으로 확인된 음이온 부위와 일치함을 보고하였고, Vernier 등²³⁾은 분자량이 12,000 dalton인 PEI를 사용하여 조사한 결과 인간의 기저막 외측판보다 기저막 내측판과 치밀판에서는 음이온부위의 수가 적고 덜 규칙적으로 분포함을 보고하였다. 본 실험에서는 분자량 50,000 dalton의 PEI를 사용하여 PEI 입자가 기저막 외측판에서는 비교적 굽고 규칙적으로 분포해 있었으나 기저막 내측판에서는 PEI 입자의 크기는 비슷하나 덜 규칙적으로 분포함을 관찰할 수 있었다. 또한 치밀판에는 비교적 작은 크기의 PEI 입자가 산재하여 있었고 사구체 간질에는 매우 불규칙하게 산재하였다. 또한 족세포의 세포질 표면에도 음이온 부위가 존재하고 있었다. 대조군에서의 이러한 소견들은 Vernier 등²³⁾이나 Okada 등¹⁷⁾의 결과와 일치하였다.

지금까지 단백뇨가 발생되는 자세한 기전은 아직 밝혀져 있지 않지만 많은 동물 실험과 인간의 사구체 질환의 연구를 통해 기저막 음이온 부위의 변화가 단백뇨와 밀접한 관계가 있을 것으로 믿어진다²⁵⁾. 이러한 연구들을 통해 사구체 모세혈관에서 전하장벽의 소실은 족세포 표면에 존재하는 음이온이 소실되는 것 보다는 기저막에 존재하는 음이온의 소실이 더욱 중요한 영향을 미친다는 것이 알려지게 되었다. 본 실험을 통해 족세포에서의 음이온 부위는 족세포가 기저막에서 탈락된 경우가 아니면 비록 족양돌기의 융합이 있더라도 대부분 유지되고 있었으며, 족세포가 기저막에서 탈락된 경우에는 족세포 뿐만 아니라 기저막 자체의 음이온도 같이 소실되었다. 따라서 상피세포 표면의 음이온의 변화는 기저막에서의 변화 만큼 모세혈관의 음전하소실에 큰 영향을 미치지 못할 것으로 생각된다. 그러나 음이온 부위의 변화에 의한 전하소실이 단백뇨와 직접 관련이 있는지에 대해서는 아직도 많은 논란이 있다. 즉 사구체 기저막의 음이

Fig. 18. Experimental rat on day 7. There is a complete loss(arrow heads) of anionic sites in the basement membrane under the epithelial detachment($\times 25,500$).

Fig. 19. Experimental rat on day 20. Most of the anionic sites(arrows) in the basement membrane are recovered($\times 25,500$).

온 전하분포가 정상적인 경우에도 단백뇨가 발생하는 반면²⁶⁾, PAN 신증의 경우²⁵⁾에도 초기 단계에 음이온 전하의 현저한 감소가 관찰된다는 보고도 있다. 그러나 Furness 등²⁷⁾은 인간의 다양한 사구체 질환에서 기저막의 음이온 소실의 정도에 상관없이 단백뇨가 발생한다고도 하였다.

본 실험에서 상피세포 족양돌기의 융합이 심하지 않거나 재생된 기저막 부위에서는 음이온 부위의 변화가 없었으나 단백뇨는 이 시기에도 지속되고 있었다. 이와 같은 사실은 Washizawa 등²⁸⁾이 미소변화형 신증후군에서 밝혔듯이 신손상이 지속적이지 않고 기저막의 손상이 복구된 경우에는 음이온 소실이 다시 정상적 분포를 취하고 단백뇨 역시 소실되기도 하나, 새로이 복구된 전하층이 비정상적인 배열과 효과적인 기능을 다하지 못할 때는 음전하의 소실이 없더라도 단백뇨가 발생될 가능성이 있다는 소견과 일치하였다. 족양돌기가 융합된 부위의 대부분의 기저막 및 세포질에 음이온이 규칙적으로 배열되어 있었지만 일부에서는 음이온 부위가 불규칙하게 배열된 곳도 관찰되었다. 이러한 음이온의 비정상적 배열이 단백뇨와 어떤 관계가 있는지는 아직 분명치 않으며 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다. 단백뇨가 심해진 7일째부터 나타난 소견 중 특이한 것은 기저막으로부터의 족세포의 탈락이다. 이 탈락된 부분의 기저막의 음이온은 완전히 소실되었으며 탈락된 상피세포의 세포질에서도 세포막의 파열로 인해 음이온이 소실되어 있었다. 이러한 족세포의 탈락에 의한 기저막 음이온의 소실로 인해 혈청단백이 요강으로 빠져나가 단백뇨가 발생되는 것으로 여겨진다.

음이온 부위와 단백뇨와의 관계는 본 실험을 통해 실험 초기에 상피세포 세포질의 변화, 즉 족양돌기의 융합이 생기더라도 그 아래 기저막 음이온 부위의 변화는 대부분 관찰되지 않았고 족세포 세포막에 존재하는 PEI 입자들도 대부분 변화가 없었으며 또한 이 시기에 단백뇨는 그다지 심하지 않았다. 따라서 저자는 족양돌기의 융합 자체는 단백뇨 발생과 직접 관계가 없을 것으로 생각된다. 그러나 음이온의 불규칙적인 배열로 인해 단백뇨가 발생되는지는 앞으로 밝혀져야 할 과제로 생각된다. 아마도 전자현미경으로 찾아내기 어려운 전하층의 작은 결손들이 지속적인 단백뇨를 발생시키거나 또는 전하층이 새로 복구되어도

비정상적인 배열로 인해서 효과적인 기능을 발휘하지 못하여 단백뇨가 발생하는 것으로 추정해 볼 수 있다.

본 실험을 통해 관찰된 단백뇨의 발생은 사구체 상피세포의 손상과 그로 인해 초래되는 사구체 기저막의 음이온 부위의 변화, 더 나아가서는 음이온 부위의 소실과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다. 이러한 사구체기저막 음이온 부위의 손상은 상피세포의 손상과 비례할 것으로 추측되며, 상피세포 족양돌기의 융합자체는 단백뇨를 발생시키지 않지만 족양돌기의 융합이 심할 수록 기저막 음이온 부위의 소실 또한 심할 것이므로 이러한 기저막 음이온부위의 변화가 단백뇨를 일으킬 것으로 추측된다.

일반적으로 세포의 활성도를 측정할 수 있는 방법으로는 (1) Tritiated thymidine을 이용한 자가방사기록법(autoradiography)²⁹⁾, (2) Flow cytometric analysis³⁰⁾, (3) 세포주기에 특이한 단일 클론 항체를 이용한 면역조직화학법에 의한 측정³¹⁾, (4) Bromodeoxyuridine 결합 후 anti-Brdu 항체를 이용한 면역조직화학법³²⁾ 등 여러가지가 있다. Thymidine을 이용한 방법은 thymidine 배양시 신선하고 살아 있는 조직을 이용해야 하며 또 방사선에 노출되는 문제점 등이 있다. 그리고 Brdu와 항 Brdu 항체법은 이러한 단점은 없으나 역시 신선하고 살아있는 조직이 필요하다. Flow cytometry는 타 방법에 비하여 잇점이 많으나 분해된 조직이 필요하므로 동시에 병리 조직학적인 관찰을 할 수 없고, 또 장비가 고가이며 방법의 복잡성 등의 문제가 있다. 이에 비하여 면역 조직화학법은 통상적인 병리조직검사 때에 시행할 수 있고 원조직의 형태를 그대로 유지한 채 타세포와의 관계를 관찰할 수 있는 잇점이 있다. PCNA에 의한 면역조직화학법^{15, 33)}은 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매된 조직을 이용할 수 있으므로 후향적인 평가도 가능하다. PCNA는 세포주기에 주 역할을 하는 단백질의 하나로서 PCNA에 대한 면역조직화학적 연구는 고정된 조직표본에서 세포증식의 세포증식의 지침이 된다는 결과가 있다³⁴⁾.

지금까지의 문헌 보고상 족세포에서 유사분열이 관찰되었다는 보고는 거의 없으며 족세포 증식의 가능성에 대한 보고도 극히 드문 실정이다^{5, 15)}. 자가방사기록법을 이용한 많은 동물실험에서 족세포는 세포분

열을 하지 않는 것으로 알려져 왔고³⁵⁾ 세포상해 후 재생도 되지 않고 유사분열도 거의 없는 고도로 분화된 세포로 간주되어 왔다³⁶⁾. 그러나 사구체 손상 때 사구체 간질세포 및 내피세포의 증식이 일어날 수 있듯이 족세포 또한 증식이 일어날 가능성은 상상할 수 있으며 최근 Floege 등¹⁵⁾이 PHN 모델에서 족세포의 증식에 관한 보고를 한 바 있다. 따라서 저자도 휘취에 PAN을 투여하여 신상해를 유발시킨 뒤 족세포가 전혀 재생되지 않는지, 해의 활성화조차 일어나지 않는지 형태학적으로 확인해 보고자 하였다. 본 연구에서는 족세포의 재생 혹은 증식여부를 관찰하기 위하여 PCNA에 대한 면역조직화학 염색법을 실시하였다. 본 실험을 통해 PCNA 양성세포는 PAN 투여 후 7일, 16일 및 20일째 유의하게 증가된 것으로 나타났다. PAN에 의한 신손상은 면역매개성이 아니므로 PCNA 양성세포의 증가는 대체로 PAN 투여후 초기에 최대치를 나타내며 PHN 모델과 같이 신손상이 면역매개성일 경우에는 PCNA 양성세포의 증가는 보다 늦게 나타난다⁵⁾. 그러나 본 연구에서는 실험초기인 7일째 3.09개로 증가되었다가 그 후 감소하다가 20일째 3.33개로 다시 증가되었다. 이러한 결과는 실험 초기의 PCNA 양성세포 수의 증가는 PAN에 의한 직접 손상에 대한 반응으로 이해되며 후반기 증가는 손상 후 cytokine 등이 관여된 이차 반응이거나 혹은 족세포 손상 후에 회복과정에서 증가하는 것으로 생각된다. 또한 다른 문헌에서 보고된 바와 같이 본 연구에서도 PCNA 양성 세포들은 사구체 모세혈관의 바깥쪽에서 염색되어 족세포로 생각되며, 보우만씨 피막의 벽상피세포에서도 염색되는 것으로 보아 이 세포들이 상피세포임은 거의 확실한 것으로 보여진다.

이상의 성적으로 PCNA 양성세포의 수는 PAN 투여후 증가되며 이와 같은 사실은 신손상 후 족세포의 증식 가능성을 시사한다고 하겠다. 이러한 족세포 증식의 의의는 PAN에 의한 족세포의 손상 후 족세포가 회복되는 과정에서 PCNA 양성세포가 출현한 것으로 생각할 수 있으나 추후 연구를 통한 규명이 있어야 될 것으로 생각된다.

= Abstract =

Morphological Changes in Glomerular Epithelial Cells and Basement Membranes in Puromycin Aminonucleoside Induced Nephropathy

Chan Oh Choi, M.D., Hyun Chul Kim, M.D.
and Kwan Kyu Park, M.D.*

*Department of Internal Medicine and Pathology,
Keimyung University*

Puromycin aminonucleoside(PAN) nephropathy was induced in a group of Sprague-Dawley rat by a single dose of intraperitoneal injection to study an ultrastructural alteration of glomerular anionic sites by stain with polyethylenimine(PEI) as a cationic probe and to examine whether proliferation of podocytes occur by immunohistochemical stain for proliferating cell nuclear antigen(PCNA).

The experimental rats developed proteinuria three days after PAN injection. Electron microscopic studies of glomeruli showed the loss of epithelial foot processes, formation of cytoplasmic vacuoles, microvillous formation and increased numbers of lysosomes in the cytoplasm of podocytes. PEI method seems to selectively stain heparan sulfate proteoglycan in basement membrane and has been widely used to evaluate the changes of basement membrane in human disease as well as in experimental work.

The anionic sites on the basement membrane with foot process fusion were mostly indistinguishable from those seen in control rats, but focal areas of loss or disarray of anionic sites were noted. The anionic sites were not seen on the basement membrane where the overlying epithelium was detached.

It is strongly suggested that proteinuria in PAN nephrosis may be primarily due to a glomerular epithelial lesion, leading to focal disarray of anionic sites or focal defects in the epithelial covering of the basement membrane. The loss of anionic sites in the basement membrane may be resulted partially from the foot process fusion and mostly from the epithelial detachment. The increased numbers of PCNA positive cells after the injection of PAN is suggestive of possibility of podocytic proliferation or regeneration.

Key Words : Puromycin, Ultrastructural, Aminonucleoside, PCNA

참 고 문 현

- 1) Frenk S, Antonowicz I, Craig JM, Metcoff J : *Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesion and body electrolyte composition.* Proc Soc Exp Biol Med 89:424-427, 1955
- 2) Ryan GB, Karnovsky MJ : *An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis.* Kidney Int 8:219-232, 1975
- 3) Inokuchi S, Sakai T, Shirato I, Tomino Y, Koide H : *Ultrastructural changes in glomerular epithelial cells in acute puromycin aminonucleoside nephrosis: a study by high-resolution scanning electron microscopy.* Virchows Arch A 423:111-119, 1993
- 4) Whiteside CI, Cameron R, Munk S, Levy J : *Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis* Am J Pathol 142:1641-1653, 1993
- 5) Yamazaki T : *Podocytic degeneration and regeneration in puromycin aminonucleoside nephropathy in the rat.* Pathol Int 45:465-472, 1995
- 6) Farquhar MG, Palade GE : *Glomerular permeability: II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephrotic rats.* J Exp Med 114:699-715, 1961
- 7) Venkatachalam MA, Karnovsky MJ, Cotran RS : *Glomerular permeability: Ultrastructural studies in experimental nephrosis using horseradish peroxidase as a tracer.* J Exp Med 130:381-399, 1969
- 8) Nagle RB, Bulger RE, Striker GE, Benditt EP : *Renal tubular effects of the aminonucleoside of puromycin.* Lab Invest 26:558-565, 1972
- 9) Caulfield JP, Farquhar MG : *Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis.* Lab Invest 39:505-512, 1978
- 10) Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA : *Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats.* Lab Invest 44:271-279, 1981
- 11) Mynderse LA, Hassell JR, Kleinmann HK, Martin GR, Hernandez AN : *Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rat.* Lab Invest 48:292-302, 1983
- 12) Groggel GC, Hovingh P, Border WA, Linker A : *Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis.* Am J Pathol 128:521-527, 1987
- 13) Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG : *Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans(heparan sulfate) by enzyme digestion.* J Cell Biol 86:688-693, 1980
- 14) Rosenzweig LJ, Kanwar YS : *Removal of sulfated (heparan sulfate) or nonsulfated(hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to 125I bovine serum albumin.* Lab Invest 47:177-184, 1982
- 15) Floege J, Johnson RJ, Alpers CE, Fatemi-Nainie S, Richardson CA, Gordon K, Couser WG : *Visceral glomerular epithelial cells can proliferate in vivo and synthesize platelet derived growth factor β -chain.* Am J Pathol 142:637-649, 1993
- 16) Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL : *The rapid determination of albumin in urine.* Pathol Int 45:465-472, 1995
- 17) Okada K, Kawakami K, Miyao M, Oite T : *Ultrastructural alterations of glomerular anionic sites in idiopathic membranous glomerulonephritis.* Clin Nephrol 26:7-14, 1986
- 18) Poppenheimer JR : *Passage of molecules through capillary walls.* Cited from Clin Nephrol 34:9-16, 1990
- 19) 박성배, 김준식, 박관구 : 실험적 IgA 신병증에서의 사구체 기저막 음이온 부위의 전자현미경적 미세 변화. 대한신장학회지 13:1-7, 1994
- 20) 박문수, 이해선, 최용, 고광욱 : *Puromycin aminonucleoside* 신증 백서에서 *captopril*이 요단백과 사구체 기저막의 음이온 부위에 미치는 영향. 대한신장학회지 16:209-220, 1997
- 21) Kanwar YS, Jakubowski ML : *Unaltered anionic sites of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis.* Kidney Int 25:613-618, 1984
- 22) Philia PA, Swain RP, William AV, Loadbolt CB, Ainsworth SK : *Glomerular anionic sites distribution in nonproteinuric rats. A computer-assisted morphometric analysis.* Am J Pathol 121:474-485, 1985
- 23) Vernier RL, Klein DJ, Sisson SP, Mahan JD, Oegema TR, Brown DM : *Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular basement membrane: Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome.* N Engl J Med 309:

1001-1009, 1983

- 24) Hiramatsu T, Matsuo S, Okura T, Yoshida F, Watanabe Y, Sakamoto N : *Heparan sulfate proteoglycan of murine glomerular basement membrane: Relationship between localization of core protein and localization of fixed negative charges.* *Jpn J Nephrol* 31:125-134, 1989
- 25) Mahan JD, Sisson RS, Vernier RL : *Glomerular basement membrane anionic charge site change early in aminonucleoside nephrosis.* *Am J Pathol* 125:393-401, 1986
- 26) Wada N, Ueda Y, Iidaka K, Inage Z, Kikkawa Y, Kitagawa T : *Portions of basement membrane with decreased negative charge in various glomerulonephritis.* *Clin Nephrol* 34:9-16, 1993
- 27) Furness PN, Turner DR, Cotton RE : *Basement membrane charge in human glomerular disease.* *J Pathol* 150:267-278, 1986
- 28) Washizawa K, Kasai S, Mori T, Komiyama A, Shigematsu H : *Ultrastructural alteration of glomerular anionic sites in nephrotic patients.* *Pediatr Nephrol* 7:1-5, 1993
- 29) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicinin MG, Gray JW : *Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine.* *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5573-5575, 1983
- 30) Dean PN, Gray JW, Dolbeare FA : *The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry.* *Cytometry* 3:188-195, 1982
- 31) Sahin AA, Ro JY, Blick MB, Naggar AK, Ordonez NG, Fritzsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG : *Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma, significant correlation with prognosis.* *Cancer* 68:549-557, 1991
- 32) Gratzner HG : *Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine. A new reagent for detection of DNA replication.* *Science* 218:474-475, 1982
- 33) Suzuki K, Katoh R, Kawaoi A : *Immunohistochemical demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in formalin-fixed, paraffin-embedded sections from rat and human tissues.* *Acta Histochem Cytochem* 25:13-21, 1992
- 34) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM : *Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues.* *Am J Pathol* 134:733-739, 1989
- 35) Fries JWU, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG : *Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat.* *Lab Invest* 60:205-218, 1989
- 36) Nagata M, Kriz W : *Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis.* *Kidney Int.* 42:148-160, 1992