

Puromycin Aminonucleoside의 투여로 유발된 백서의 미세변화신증과 국소성분절성사구체경화증에서 Cyclosporine A의 효과

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

성 순 희

The Effects of Cyclosporine A on Minimal Change Nephrosis and Focal Segmental Glomerulosclerosis Induced by Administration of Puromycin Aminonucleoside in Rats

Sun Hee Sung, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Woman's University

Cyclosporine A(CsA) is known as a potent immunosuppressive agent, and recently its suppressive effects of proteinuria in minimal change nephrotic syndrome, and other glomerular diseases have been demonstrated. But the mechanism of suppression of proteinuria is not clear. This study aimed to investigate the mechanism of suppression of proteinuria in puromycin aminonucleoside (PAN) induced minimal change nephrosis(MCN), by a single dose of PAN, and focal segmental glomerulosclerosis(FSG) by long term repeated administration of PAN with unilateral nephrectomy in Sprague-Dawley rats, using transmission electron microscopy. We also analysed the effects of CsA on the histopathologic changes such as glomerular sclerosis, and subtypes of infiltrated mononuclear cells in glomeruli and renal interstitium. The results are as follows: Marked proteinuria was developed in MCN and FSG groups. It was significantly reduced by administration of CsA. BUN and creatinine were significantly increased in FSG with the administration of CsA, compared with FSG without CsA. On ultrastructural examination, MCN group showed effacement of foot processes, and microvillous transformation. Occasional focal detachment of podocytes from the GBM, vacuolar degeneration, and electron dense droplets in the podocytes were also seen. The latter findings were remarkably reduced by CsA. The Above ultrastructural findings, seen in the MCN group, were more severe in the FSG groups. On comparison of ultrastructural findings of FSG with or without CsA groups, severe vacuolar degeneration, abundant electron dense granules, and focal detachment of foot processes were more frequently seen in FSG groups and they were significantly reduced by CsA. But irregularity and thickening of GBM were deepend in FSG with CsA group. There were no significant differences of glomerular sclerosis, adhesion to the Bowman's capsules in both the MCN and the FSG groups by administration of CsA. Foamy degeneration of endothelial and mesangial cells, epithelial proliferation, hyalinosis

and mononuclear infiltration were significantly reduced by CsA in FSG groups. Microcalcification was commonly seen in CsA administrated groups. The main subtype of infiltrated mononuclear cells in glomeruli and interstitium were monocytes in FSG groups. The proportion of T cells were higher in interstitium by disease progression and it was significantly decreased by CsA. On conclusion the most important ultrastructural changes, regarded as the main mechanism of suppression of proteinuria is that the CsA stabilize the podocytes, by preventing vacuolar degeneration and focal detachment. But CsA does not influence the progression of glomerular sclerosis in PAN induced nephrosis. (Korean J Pathol 1996; 30: 981 ~ 997)

Key Words: Minimal change disease, Focal segmental glomerulosclerosis, Cyclosporine A, Puromycin aminonucleoside, Ultrastructure

서 론

Puromycin aminonucleoside(6-dimethylaminopurine-3-amino-d-ribose, 이하 PAN으로 약함)는 transfer RNA와 구조적으로 유사하여 미생물의 단백질 합성과정을 방해함으로써 약리효과를 내는 항생제로 처음 알려졌는데 이후 백서에서 신증후군을 일으키는 대표적 모델로 많이 이용되고 있다^{1,2}. PAN을 일회 단기투여시에는 인체에서 발생하는 미세변화신증후군과 유사한 변화를 일으켜 단백뇨를 비롯한 신증후군을 나타내어 PAN 급성 모델로 미세변화신증(minimal change nephrosis, 이하 MCN으로 약함)의 연구에 널리 이용되고 있다. 일측 신절제 후 장기적 반복투여시에는 국소성분절성사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis, 이하 FSG로 약함)을 일으키기 때문에³⁻⁵ 미세변화신증후군과 FSG가 동일한 질환 스펙트럼이면서 서로 다른 병리조직학적 및 임상적 경과를 거치는 것이라는 주장의 근거가 되기도 한다⁶.

PAN투여로 인한 단백뇨의 유발기전은 크게 두가지로 대별되는데 사구체 기저막의 음이온 장벽의 소실에 의한다는 설⁷⁻⁹과 기저막으로부터 사구체 족세포의 국소적 탈락이 주된 기전이라는 주장이 있다¹⁰⁻¹³. PAN의 장기투여시의 FSG로의 진행기전은 일차적으로 족세포에 독성 손상이 가해져 투과 선택성이 변경되고 이로 인해 단백질이 지속적으로 과부하됨으로써 비가역적, 진행성으로 사구체의 경화성 변성을 유발하는 것으로 설명하기도 하나^{3,6,14}, 메산지움에 거대분자의 과부하로 메산지움세포의 손상 및 증식으로 인한 세포외기질의 증가가 경화

의 첫요인으로 거론되기도 한다^{5,16}. 한편 Olson등¹⁷은 초기의 과여과에 따른 내피세포의 손상이 선행하여 혈장성분의 축적으로 인한 초자양변화가 생기고 이것이 경화의 초기단계라 주장하기도 한다. 그 이후 병변의 진행에 따른 신기능의 저하는 사구체의 단백질 침윤 및 경화와 신간질의 단백질 침윤 및 섬유화가 중요한 역할을 하리라 여겨지고 있으며¹⁸⁻²² 또한 Eddy 및 Michael²³은 신간질의 이같은 변화가 FSG에 수반되는 이차적 변화가 아니라 FSG의 전구 병변으로 간주하고 있다.

한편 cyclosporine A(이하 CsA로 약함)는 Cyclosporin lucidum과 Trichoderma polysporum 곰팡이에서 추출한 hydrophobic cyclic endecapeptide로 강력한 면역억제효과가 있음이 보고된 이래 장기이식 후 또는 자가면역 질환의 치료 목적으로 널리 사용되고 있다²⁴⁻²⁷. CsA의 면역억제의 작용기전으로는 T보조세포로부터 lymphokine 특히 interleukin 2의 생성을 억제하여 T세포 및 B세포의 성숙에 필요한 자극을 차단하고 세포 독성 T림프구의 증식을 저지하여 조직 손상을 막는 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁸. 또한 CsA는 단백뇨를 동반하는 여러 사구체 질환 특히 미세변화 신증후군과 면역 매개성 사구체 질환에서 좋은 치료 효과를 보이는 것으로 최근 보고되고 있고 FSG에서는 부분적인 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다²⁹⁻³³.

CsA의 단백뇨의 억제기전에 대해서는 아직 정확한 기전이 알려져 있지 않다. Roveva등³⁴은 원발성 신증후군이 T림프구의 기능의 이상과 관련이 되기 때문에 면역억제기능과 같이 CSA의 Interleukin-2의 억제효과가 직접 단백뇨를 억제하는 것이라 하였다. Tanabe³⁵는 PAN유발신증에서의 음이온부위의 감소

가 CsA투여에 의하여 정상화되었기 때문에 CsA가 음이온부위를 안정화시킬 것으로 해석하였으나 이는 음이온부위와는 무관하다는 Kokui³⁶의 연구결과와 상반된다. Wang등³⁷은 superoxide dismutase 등 항산화효소치가 CsA투여에 의하여 증가되는 것을 관찰하고 CsA가 항산화효소를 증가시켜 PAN에 의한 세포독성을 줄일수 있다고 하였다. 그러나 PAN유발 미세변화신증에서의 CsA에 의한 미세구조의 형태학적 변화에 대해서는 심층적인 연구가 없으며 사구체의 경화의 진행정도에 대한 CsA비투여 PAN유발 미세변화신증과의 비교에 대해서는 서로 상반된 결과를 보이고 있다^{35,36}. 또한 국소성분절성사구체경화증 유발에서의 CsA의 효과와 경화의 진행에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 백서에서 PAN의 일회 투여로 단백뇨를 유발시켜 미세변화신증후군과 동일한 모델을 만들고, 또한 일측 신절제후 PAN의 장기 반복투여로 FSG를 유발시킨후 CsA에 의한 두질환에서 초미세구조형태학적인 변화를 검색함으로써 CsA가 단백뇨를 억제하는 기전을 찾고자 하였다. 그외 두질환모델에서 CSA가 사구체의 경화를 비롯한 신장의 병리조직학적 소견에 미치는 영향을 알고자 하였으며 아울러 단백뇨의 침윤의 정도와 종류에 어떤 영향을 미치는지를 비교 연구해보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물과 사료: 실험동물로는 기초사육후 1주일간 환경에 적응시킨 생후 8~10주 사이의 체중 140~180 g사이의 숫컷 Sprague-Dawley계의 백서를 사용하였다. 실험 전기간동안 조단백질 15%, 지방 3%가 함유된 표준 시판 사료를 공급하며 24시간 단백뇨측정기간과 채혈 전 18시간 동안은 물을 제외하고는 금식시켰다.

2) 실험약제: Puromycin aminonucleoside(Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA)는 6-dimethylaminopurine-3-amino-D-ribose이며 복강내 주사용으로는 20 mg/ml로 생리 식염수에 녹이고 피하주사용으로는 100 mg을 생리 식염수 100 ml에 녹여 주사용 제제로 만들어 사용하였다. Cyclosporine A는 Sandoz (Basel, Swiss)회사제품의 주사용제제를 사용하였다.

2. 방 법

1) 실험군 분류: 총 100마리의 백서를 다음과 같이 8군으로 분류하였다.

- 제 Ia 군 : 정상 대조군 (5마리)
- 제 IIa 군 : 실험대조군 (CsA단독투여군, 5마리)
- 제 IIIa 군 : 미세변화신증 유발군 (15마리)
- 제 IVa 군 : 미세변화신증 유발 + CsA투여군 (15마리)
- 제 Ib 군 : 일측 신절제군 (10마리)
- 제 IIb 군 : 일측신절제 + CsA투여군 (10마리)
- 제 IIIb 군 : 국소성분절성사구체경화증 유발군 (20마리)
- 제 IVb 군 : 국소성분절성사구체경화증 유발 + CsA투여군(20마리)

실험방법을 간략히 표기하면 Fig. 1과 같다.

2) 일측 신절제술: FSG유발군은 secobarbital 30 mg/kg(제일약품)를 복강내 주사하여 마취시킨 후 좌측 측복부를 절개하고 좌측신장을 박리, 노출하여 신동맥, 신정맥, 요관을 한꺼번에 3-0 Ethilon으로 결찰하고 신장을 적출한 뒤 피부를 봉합하였다.

3) 약제 투여 방법: 정상군은 표준사료와 수돗물을 자유롭게 먹게 하였다. MCN 유발군은 PAN 15 mg/100g을 단 일회로 복강내에 주사하였다. 이후 3주가 지난 후 희생시켰다.

CsA는 주사용 제제를 1:10으로 생리 식염수에 희석하여 MCN 신증 모델인 경우 PAN투여 3일째되는 날부터 3주간에 걸쳐 매일 1회 10 mg/kg의 용량을 총 19회 복강내에 투여하였다.

FSG유발군은 PAN투여 1주전에 일측 신절제를 시행하고 PAN 1 mg/100g씩을 하루 일회씩 연속 3일 피하주사로 투여하고 4일 쉬는 방법으로 희생시키기 전까지 8주에 걸쳐 총 24회 투여하였다.

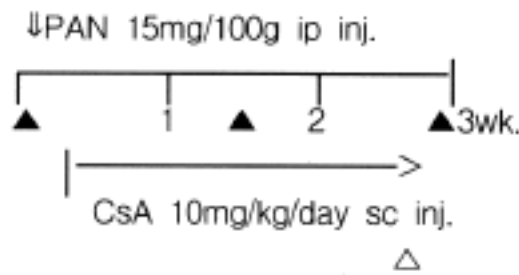
CsA는 PAN투여 3일째되는 날부터 희생시키기 전까지 하루 1회 10 mg/kg의 용량을 매일 복강내에 투여하였다.

4) 단백뇨의 측정 및 혈액화학 지표의 분석:

(1) 단백뇨의 측정: MCN모델의 경우 하루 전, 10일째 그리고 희생시키기 하루전에 acryl metabolic cage에 한마리씩 넣고 24시간 뇨를 수거하여 trichloroacetate법으로 뇨단백을 측정하였다. FSG모델의 경우 PAN투여 하루 전, 투여기간중 2, 4, 6주 및 희생하루 전까지 총 5회 뇨단백을 측정하였다.

(2) 혈액화학 검사: MCN모델의 경우 PAN투여 2주일째 그리고 희생시킬때 혈액을 채취하여 3000 rpm으로 15분간 원심 분리후 혈청을 -70°C로 보관한후 일시에 Hitachi-747 다중 분석기를 이용하여 혈액화학검사를 시행하였다. FSG모델의 경우 28일째

Minimal change nephrosis groups



Focal segmental glomerulosclerosis groups

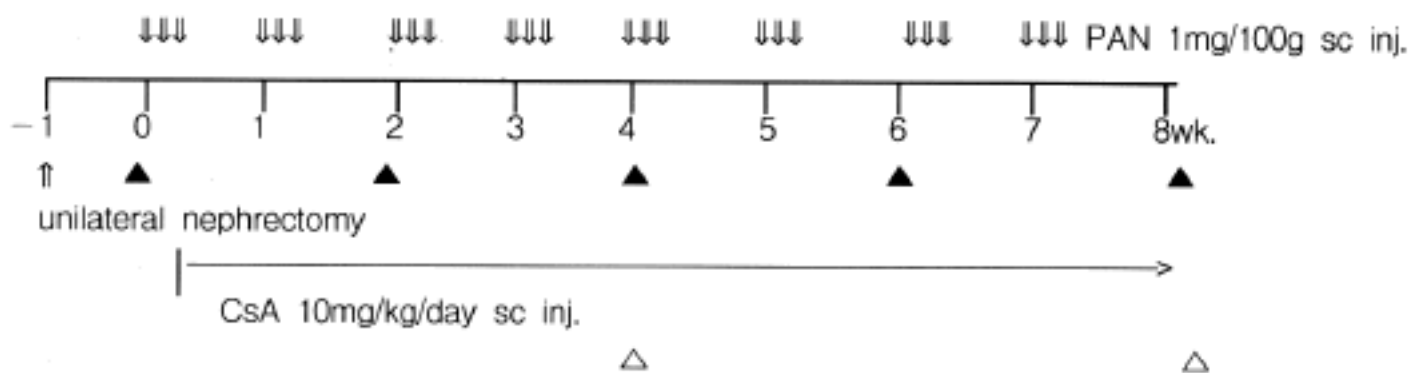


Fig. 1. Schematic summary of experiment. Methods of induction of MCN & FSG, cyclosporine A administration, periods of collection of specimen & sacrifice. ▲: 24 hr urine protein, PAN: puromycin aminonucleoside, CsA: cyclosporin A, inj.: injection, sc: subcutaneous, ip: intraperitoneal, △: sacrifice, blood sampling & pathological examination

중간희생시와 56일째 최종희생시에 혈액을 채취하였다.

5) 병리조직학 검색: 희생후에 신장을 적출하여, 무게를 측정하였다. 신장조직의 일부는 phosphate완충액에 희석한 10%포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하고 3 μ두께로 세절하여 hematoxylin-eosin염색, periodic acid-Schiff염색 및 Masson's trichrome염색을 각각 실시하여 관찰하였다. 각 군의 신장 조직에서 마리당 100개의 사구체를 검사하여 MCN유발군에서는 사구체의 경화, Bowman피막으로의 부착, 사구체 모세혈관의 초자양 변화, 메산지움의 세포증식의 여부를 관찰하여 수치화하고 아울러 신 세뇨관과 신간질의 변화의 여부도 관찰하였다. FGS유발군에서는 이에 더하여 사구체모세혈관의 내피세포, 메산지움 세포의 포말상 변화와 사구체내 상피세포의 분절성 증식유무, 사구체 및 신간질의 단백질의 침윤의 정도, 섬유화의 정도를 관찰하여 이를 수치화 또는 등급화하였다. 아울러 CsA에 의한 신독성에 따른 형태학적인 변화의 여부를 관찰하였다.

6) 전자현미경 검색: 각 군당 4예씩 총 32예의 신선한 신조직을 채취 즉시 3% glutaraldehyde완충용액

에 고정하여 Epon에 포매하였다. Epon포매조직을 ultramicrotome을 이용하여 5 nm 두께로 세절하고, 초박절편을 만들어 copper grid에 mount하였다. uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과 전자현미경적 검사를 시행하였다. 각 군에서의 사구체의 미세구조 변화, 특히 족세포의 돌기변화, 족세포의 기저막으로부터의 탈락여부, 세포질의 공포성 변성, 세포질내 세포골격(cytoskeleton)인 미세사의 변화와 전자고밀도 과립의 수 및 크기의 변화, 메산지움의 기질의 변화, 사구체기저막의 변화, 사구체내피세포의 변화, 세뇨관세포의 변화등을 면밀히 비교 관찰하였다. 관찰결과는 등급화하여 표기하였고 등급의 기준은 마리당 5개이상의 사구체를 관찰하여 사구체의 모세혈관고리 및 메산지움에서 전혀 변화가 없을때 ±, 약 1/3까지에서 변화가 관찰될때 +, 2/3까지는 ++, 그 이상의 경우 +++로 정하였으며 최종 등급의 결정은 최빈치를 대표값으로 하였다.

7) 면역 조직화학 검색: 파라핀 포매조직을 이용하여 LSAB(labelled streptavidin biotin)방법으로 탐식구에 대한 일차 항체(CD68, DAKO, Carpinteria, CA, USA), T림프구에 대한 일차 항체(UCHL, DAKO, Carpinteria, CA, USA), B림프구에 대한 일차 항체

(L26, DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하고 형태 계측학적인 방법을 이용하여 사구체내에 양성으로 침윤된 단핵구에

대해서는 마리당 100개의 사구체를 관찰하여 양성인 세포수의 평균값을 내었고, 신간질에서는 침윤된 단핵구 100개를 세어 그중 양성을 보이는 단핵구의 수를 세어 비교하였다.

Table 1. Survival rates of experimental animals

| Experimental groups | No. of animals | No. of survival animals(%) |
|---------------------|----------------|----------------------------|
| Ia | 5 | 5 (100) |
| IIa | 5 | 5 (100) |
| IIIa | 15 | 15 (100) |
| IVa | 15 | 12 (80) |
| Ib | 10 | 10 (100) |
| IIb | 10 | 10 (100) |
| IIIb | 20 | 13 (65) |
| IVb | 20 | 11 (55) |
| Total | 100 | 81(81) |

Table 2. Changes of 24 hr urine protein excretion according to cyclosporine A in minimal change nephrosis rats

| Exp. groups | -1st day | 10th day | 20th day |
|-------------|-------------|---------------|---------------|
| Ia | 23.0 ± 13.0 | 25.2 ± 14.5 | 15.6 ± 7.1 |
| IIa | 21.6 ± 10.1 | 19.6 ± 8.3 | 17.2 ± 6.1 |
| IIIa | 21.3 ± 11.2 | 328.7 ± 56.3* | 289.6 ± 64.6* |
| IVa | 20.7 ± 7.5 | 106.9 ± 17.9 | 139.2 ± 54.4 |

1. Values are mg and are given as mean and standard deviation.
2. * IIIa is significantly higher than Ia, IIa(p<0.0001) & IVa(P<0.01).

Table 3. Changes of 24 hr urine protein excretion according to cyclosporine A in focal segmental glomerulosclerosis rats

| Exp. groups | 0 wk | 2 wks | 4 wks | 6 wks | 8 wks |
|-------------|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ib | 14.2 ± 0.40 | 27.6 ± 11.8 | 30.6 ± 13.5 | 47.6 ± 21.2 | 28.8 ± 9.3 |
| IIb | 34.1 ± 15.2 | 36.7 ± 11.3 | 37.4 ± 23.7 | 40.6 ± 32.3 | 41.0 ± 21.2 |
| IIIb | 21.8 ± 7.6 | 493.1 ± 219.2* | 2269.2 ± 627.8* | 3258.6 ± 587.8* | 3245.7 ± 908.6* |
| IVb | 21.8 ± 5.5 | 146.9 ± 75.6 | 659.8 ± 220.3 | 908.3 ± 346.3 | 942.7 ± 361.9 |

1. Values are mg and are given as mean and standard deviation.
2. * IIIb is significantly higher than Ib, IIb, IVb(P<0.001).

Table 4. Changes of BUN, creatinine, serum albumin, cholesterol and triglyceride according to the CsA in MCN rats

| Lab. | Ia | IIa | IIIa | IVa |
|--------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| BUN | 10.4 ± 2.9 | 14.8 ± 3.3 | 12.7 ± 4.2 | 16.5 ± 3.5* |
| creatinine | 0.40 ± 0.07 | 0.36 ± 0.05 | 0.34 ± 0.05 | 0.43 ± 0.17 |
| albumin | 4.02 ± 0.13 | 3.98 ± 0.13 | 3.69 ± 0.53 | 3.85 ± 0.33 |
| cholesterol | 85.4 ± 14.2 | 77.4 ± 9.3 | 119.9 ± 46.9** | 96.3 ± 19.4 |
| triglyceride | 54.6 ± 3.8 | 49.6 ± 5.5 | 93.3 ± 40.6*** | 78.2 ± 26.3 |

1. Values of BUN, creatinine, cholesterol, triglyceride are mg/dl and albumin is g/dl. They are given as mean and standard deviation.
2. * IVa is significantly higher than Ia (P<0.01).
3. ** IIIa is significantly higher than IIa (P<0.05).
4. *** IIIa is significantly higher than Ia, IIa (P<0.05).

3. 자료분석 및 통계처리방법

실험자료중 수치화된것은 평균±표준편차로 표시하였으며, 통계학적인 분석은 각 실험군의 변화를 비교분석하기 위하여 SAS program을 이용한 이요인 분산분석(two way ANOVA)을 시행하였으며, p값이 0.05미만인 경우를 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 실험백서의 생존율

총 100마리의 백서를 이용하였는데 이중 19마리는 실험기간중 사망하였다(Table 1). 실험중 사망한 동물은 IVb군이 9마리(45%)로 가장 많았고 IIIb군이 7마리(35%), IVa군이 3마리(20%)순이었다. 실험도중 사망한 동물은 연구대상에서 제외하였으며 생존했던 81마리를 대상으로 결과를 얻었다.

2. 24시간 뇨단백배설량의 변화

1) 미세변화신증유발백서에서의 비교: 실험전일 측정시에는 네군이 모두 비슷하였으나 실험 10일째와 실험 20일째에는 IIIa(미세변화신증유발백서군)이 각각 328.7 ± 56.3 mg, 289.6 ± 64.6 mg으로(Table 2) 같은 기간에 측정한 Ia, IIa군에 비하여 현저히 증가하였다($p < 0.001$). 반면 CsA투여군인 IVa군은 각각 106.9 ± 17.9 mg, 139.2 ± 54.4 mg으로 IIIa군에 비하여 유의있게 감소하였다($p < 0.01$).

2) 국소성분절성사구체경화증유발 백서군의 비교: 정상 및 실험대조군인 Ib와 IIb군은 실험전일과 2, 4, 6, 8주 전 검사기간동안 큰 차이가 없었으나 IIIb군은 2주부터 단백뇨가 493.1 ± 219.2 mg으로 증가하기 시작하여 6주째와 8주째에는 각각 3258 ± 587.8 mg과 3245.7 ± 908.6 mg으로 매우 심한 단백뇨를 보였다 (Table. 3). 한편 CsA투여군에서는 실험 2주째와 6주째에 각각 146.9 ± 75.6 mg과 908.3 ± 346.3 mg으로 현저한 단백뇨의 억제경향을 보였으며 이는 통계학적으로 유의하였다($p < 0.001$).

3. 혈액화학적 지표의 변화

1) 미세변화신증유발백서에서의 변화: 혈중 요소질소는 CsA단독투여군인 IIa군이 14.8 ± 3.3 mg/dl, 미세변화신증에서 CsA투여군인 IVa군이 16.5 ± 3.5 mg/dl로 CsA비투여군인 Ia와 IIIa가 각각 10.4 ± 2.9 mg/dl과 12.7 ± 4.2 mg/dl인데 비하여 높았으며 Ia군과 비교하여 통계학적으로 유의하였다($P < 0.01$). 크레아티

Table 5. Changes of BUN, creatinine, serum albumin, cholesterol and triglyceride according to the CsA in FSG rats

| Lab. | Exp. groups | 28th days | 56th days |
|----------------------|-------------|------------------------|-------------------------|
| BUN | | | |
| | Ib | 11.8 ± 4.9 | 10.4 ± 4.0 |
| | IIb | 16.8 ± 1.9 | 16.6 ± 1.9 |
| | IIIb | $25.2 \pm 4.5^{**}$ | $46.0 \pm 8.8^{**}$ |
| | IVb | $84.8 \pm 20.8^{\#}$ | $98.3 \pm 18.8^{\#}$ |
| creatinine | | | |
| | Ib | 0.34 ± 0.06 | 0.36 ± 0.06 |
| | IIb | 0.4 ± 0.07 | 0.52 ± 0.13 |
| | IIIb | $0.88 \pm 0.24^{**}$ | $0.93 \pm 0.16^{**}$ |
| | IVb | $1.64 \pm 0.37^{\#}$ | $1.72 \pm 0.17^{\#}$ |
| serum albumin | | | |
| | Ib | 4.06 ± 0.21 | 3.98 ± 0.13 |
| | IIb | 3.96 ± 0.32 | 3.98 ± 0.27 |
| | IIIb | $2.07 \pm 0.21^{\#}$ | $2.06 \pm 0.31^{\#}$ |
| | IVb | $2.00 \pm 0.25^{\#}$ | $1.90 \pm 0.28^{\#}$ |
| cholesterol | | | |
| | Ib | 86.8 ± 22.3 | 98.6 ± 20.4 |
| | IIb | 87.2 ± 10.1 | 87.4 ± 14.7 |
| | IIIb | $441.2 \pm 150.9^{\#}$ | $499.4 \pm 144.3^{\#}$ |
| | IVb | $442.0 \pm 110.8^{\#}$ | $399.7 \pm 93.7^{##}$ |
| triglyceride | | | |
| | Ib | 58.8 ± 10.6 | 60.8 ± 10.4 |
| | IIb | 52.8 ± 9.0 | 57.8 ± 14.5 |
| | IIIb | $468.5 \pm 69.1^{\#}$ | $1091.3 \pm 446.4^{\#}$ |
| | IVb | $392.2 \pm 188.4^{##}$ | $435.1 \pm 214.1^{##}$ |

1. Values of BUN, creatinine, cholesterol, triglyceride are mg/dl and albumin is g/dl.

They are given as mean and standard deviation.

- * IVb is significantly higher than Ib, IIb, IIIb ($p < 0.01$)
- ** III is significantly higher than Ib, IIb ($p < 0.01$)
- # IIIb, IVb are significantly higher than Ib, IIb ($p < 0.05$)
- ## IVb is significantly higher than IIIb ($p < 0.05$)

닌은 각군사이에 별다른 차이가 없었다. 혈청 알부민은 IIIa군이 3.69 ± 0.53 g/dl로 정상군의 4.02 ± 0.13 g/dl과 IVa군의 3.85 ± 0.33 g/dl에 비하여 낮은 경향을 보였다. 혈중 콜레스테롤 및 triglyceride는 정상군이 각각 85.4 ± 14.2 mg/dl, 54.6 ± 3.8 mg/dl인데 비하여 IIIa군에서는 각각 119.9 ± 46.9 mg/dl, 93.3 ± 40.6

mg/dl으로 증가하였으며 이는 CSA의 투여에 의하여 각각 96.3 ± 19.4 mg/dl, 78.2 ± 26.3 mg/dl로 감소하는 경향을 보였다(Table 4).

2) 국소성분질성사구체경화증유발백서에서의 변화: 혈중요소질소 및 크레아티닌은 정상대조군(Ib군)에 비하여 FSG유발군에서 28실험일과 56실험일에 각각 25.2 ± 4.5 mg/dl, 0.88 ± 0.24 mg/dl과 46.0 ± 8.8 mg/dl, 0.93 ± 0.16 mg/dl로 증가하였으나 FSG유발에 CsA를 투여한 군에서는 28실험일과 56실험일에 각각 84.8 ± 20.8 mg/dl, 1.64 ± 0.37 mg/dl과 98.3 ± 18.8

mg/dl, 1.72 ± 0.17 mg/dl로 FSG단독유발군에 비하여 현저히 증가하였다. CsA단독투여군(IIb군)은 정상대조군에 비하여 56실험일에 혈중요소질소와 크레아티닌이 경미한 증가를 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 혈중 알부민은 정상대조군에 비하여 28실험일과 56실험일에 IIIb군과 IVb군에서 각각 2.07 ± 0.21 g/dl, 2.06 ± 0.31 g/dl과 2.00 ± 0.25 g/dl, 1.90 ± 0.28 g/dl로 심한 감소를 보였으며 IIIb군과 IVb군 사이에는 차이가 없었다. 혈청 콜레스테롤과 triglyceride 역시 FSG유발군에서 정상군에 비하여 심

Table 6. Comparison of renal histopathologic changes according to the CsA in MCN rats

| Histopathologic findings | Ia | IIa | IIIa | IVa |
|---------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Glomerular segmental sclerosis | 0.80 ± 0.8 | 0.80 ± 0.80 | $2.33 \pm 1.04^*$ | 1.92 ± 1.16 |
| Adhesion to the Bowman's capsules | 1.60 ± 1.0 | 1.00 ± 0.7 | $5.93 \pm 2.25^{**}$ | 4.17 ± 2.40 |
| Hyalinosis of capillary loops | 1.20 ± 0.8 | 0.80 ± 0.80 | 1.73 ± 1.09 | 1.17 ± 1.02 |
| Mesangial hypercellularity | 5.60 ± 1.1 | 6.60 ± 3.5 | $12.87 \pm 4.88^{\#}$ | 8.25 ± 3.76 |
| Interstitial mononuclear infiltration | - | - | - ^ - | - |
| Interstitial fibrosis | - | - | - | - |
| Microcalcification | - | + | - | + |

1. Values are % of glomerular changes/ more than 100 glomeruli. They are given as mean and standard deviation.
2. * Ia, IIa are significantly higher than IIIa ($p < 0.01$)
3. ** Ia, IIa are significantly higher than IIIa ($p < 0.001$)
4. # IIIa is significantly higher than Ia, IIa, IVa ($p < 0.01$)

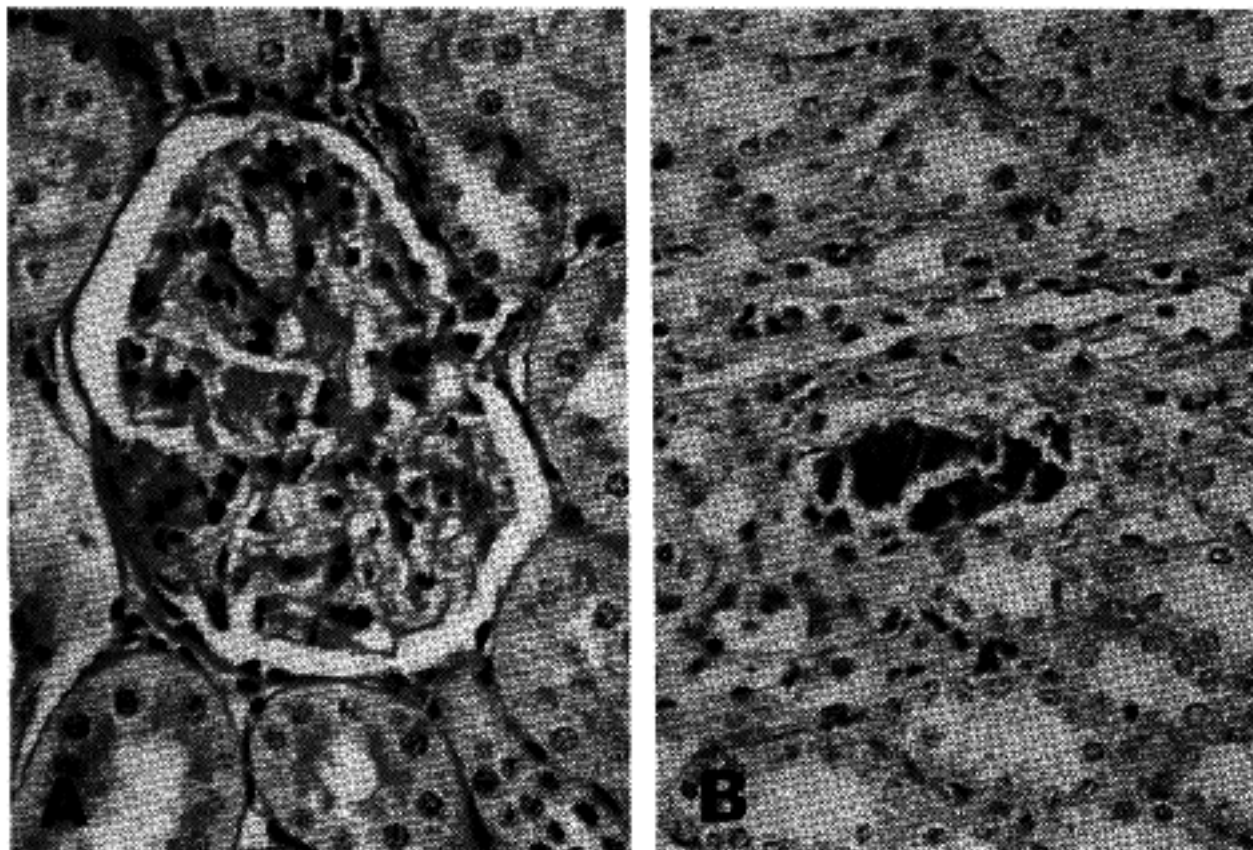


Fig. 2. Segmental sclerosis with adhesion to the Bowman's capsule is seen in minimal change nephropathy (A, PAS $\times 200$). Microcalcification is noted in MCN with CsA (B, H&E $\times 200$).

Table 7. Comparison of renal histopathologic changes according to the CsA in FSG rats

| Histopathologic findings | Ib | IIb | IIIb | IVb |
|---|----------------------------|----------------------------|---|--|
| | 28th days | 28th days | 28th days | 28th days |
| | 56th days | 56th days | 56th days | 56th days |
| Glomerular sclerosis | 0.8 ± 0.84 2.0 ± 0.72 | 0.8 ± 0.84 1.2 ± 1.14 | 17.3 ± 4.03 ¹ 37.43 ± 7.18 [*] | 17.8 ± 4.02 [*] 37.5 ± 8.01 [~] |
| Adhesion to the Bowman's capsules | 6.40 ± 1.1 7.6 ± 2.7 | 6.60 ± 1.1 7.2 ± 1.5 | 42.33 ± 12.8 [*] 48.23 ± 7.6 [*] | 33.8 ± 12.3 [~] 58.0 ± 11.1 [*] |
| Foam cell changes of glomerular cells | 0.0 ± 0.0 0.0 ± 0.0 | 0.20 ± 0.44 0.40 ± 0.54 | 18.0 ± 4.85 53.86 ± 9.33 | 6.8 ± 4.2 ^{**} 12.0 ± 5.24 ^{**} |
| Segmental epithelial proliferation | 0.2 ± 0.45 0.2 ± 0.45 | 0.4 ± 0.45 0.2 ± 0.45 | 6.83 ± 3.06 24.71 ± 9.53 | 3.20 ± 1.30 ^{**} 8.17 ± 1.72 ^{**} |
| Mesangial proliferation | 6.40 ± 1.34 8.80 ± 2.86 | 6.60 ± 1.14 8.40 ± 2.30 | 32.33 ± 6.01 27.14 ± 7.81 | 27.20 ± 7.46 54.17 ± 12.95 |
| Hyaline changes of glomerular capillary loops | 0.20 ± 0.44 0.40 ± 0.89 | 0.20 ± 0.44 0.40 ± 0.54 | 6.17 ± 1.47 21.71 ± 6.47 | 4.80 ± 2.16 ^{**} 3.17 ± 0.74 ^{**} |

1. Values are % of glomerular changes/ more than 100 glomeruli. They are given as mean and standard deviation.
2. *IIIb, IVb are significantly higher than Ib, IIb ($p < 0.001$)
3. **IVb is significantly higher than Ib, IIb and is significantly lower than IIIb ($p < 0.001$)

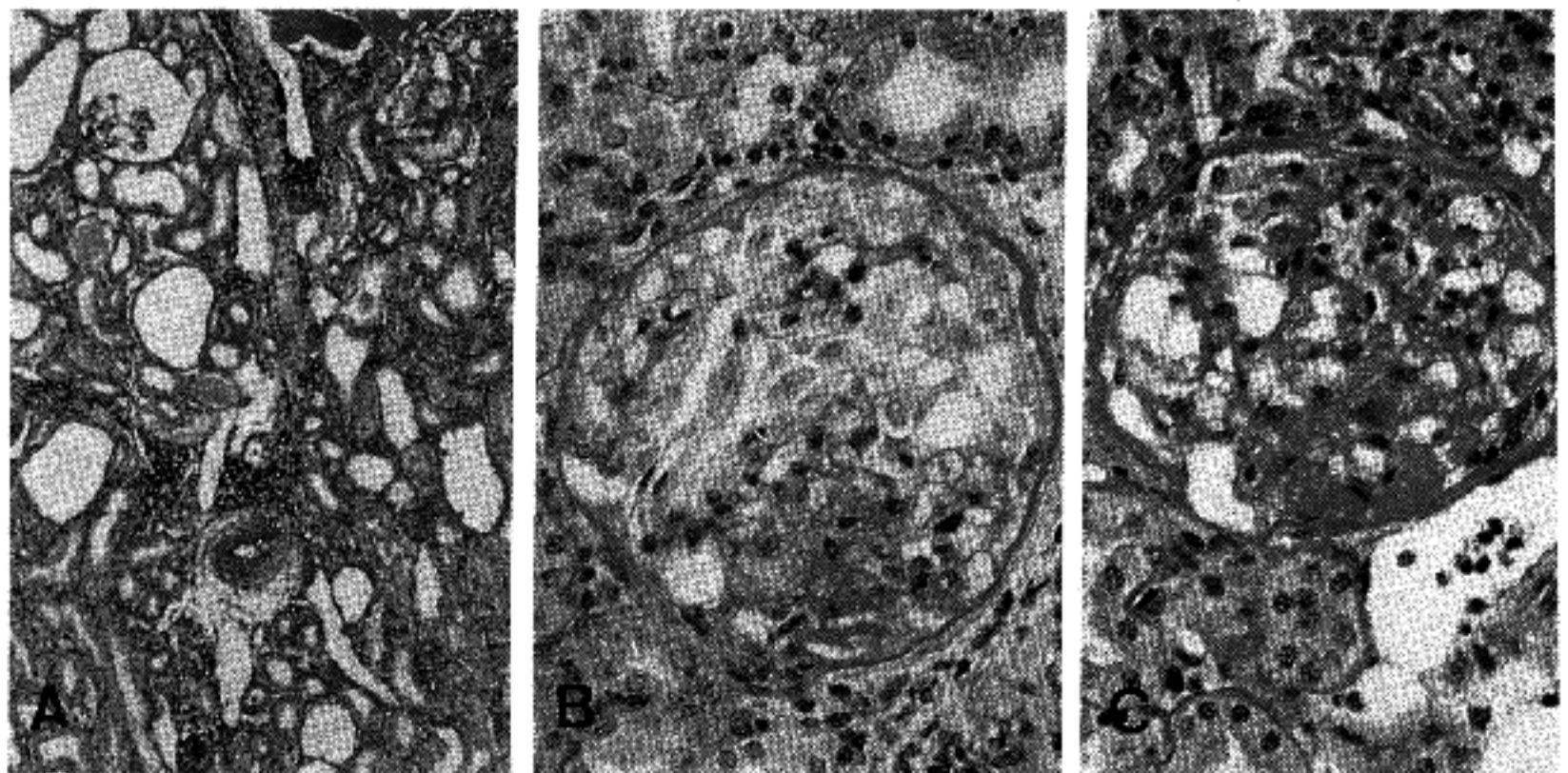


Fig. 3. Renal histopathologic findings of FSG group. Frequent mononuclear infiltration, tubular atrophy or dilatation (A, PAS ×40), Segmental sclerosis and epithelial proliferation of glomerulus (B, PAS ×200), and foam cell change of endothelial and mesangial cells, hyalinosis of capillary loops (C, PAS ×200) are noted.

한 증가를 보였으며 CsA투여에 의하여 triglyceride는 392.2 ± 88.4 mg/dl과 435.1 ± 214.1 mg/dl로 감소하였고 56실험일째의 콜레스테롤 또한 유의하게 감소하였다 (Table 5).

4. 병리조직학적 변화

1) 미세변화신증유발군의 신장의 광학현미경적 소견: MCN유발군에서 사구체의 분절성 미세경화, Bowman 피막으로의 부착, 비산지움의 세포증식이 정상대조군에 비하여 증가하였으며($p < 0.01$) 이는 CsA투여에 의하여 둔화되는 경향이었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 한편 CsA단독투여군(IIa군)이나 MCN

유발에 CsA병용투여군(IVa군)에서는 신수질의 간질에서 석회화가 대부분의 예에서 관찰되었다(Table 6, Fig. 2).

2) 국소성분절성사구체경화증유발군의 신장의 광학현미경적 소견: FSG유발군(IIIb군)과 FSG유발에 CsA를 투여한군(IVb군)은 공히 사구체의 심한 분절성 경화와 빈번한 Bowman피막으로의 부착을 보였는데 이는 28실험일보다 56실험일에 더욱 현저하였다($p < 0.001$). 그러나 IIIb군과 IVb군사이에는 경화의 정도의 차이는 없었다(Table 7). 상피세포의 증식, 사구체내피세포의 포말상 변화, 사구체모세혈관의 초자양 변화는 IIIb군에서 심하였으며(Fig. 3) 이는 CsA

Table 8. Comparison of renal tubulointerstitial changes according to the CsA in FSG rats

| Histopathologic findings | Ib | | IIb | | IIIb | | IVb | |
|---------------------------------------|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-------|
| | 28th days/56th days | | 28th days/56th days | | 28th days/56th days | | 28th days/56th days | |
| Interstitial mononuclear infiltration | -/- | -/- | -/- | -/- | +/- | +/- | -/+ | -/+ |
| Interstitial fibrosis | -/- | -/- | / | / | -/- | -/+ | +/- | +/- |
| Tubular atrophy or dilatation | -/- | -/- | -/- | -/- | / | / | ++/+- | ++/+- |
| Microcalcification | -/- | -/- | / | / | -/- | -/- | +/- | +/- |

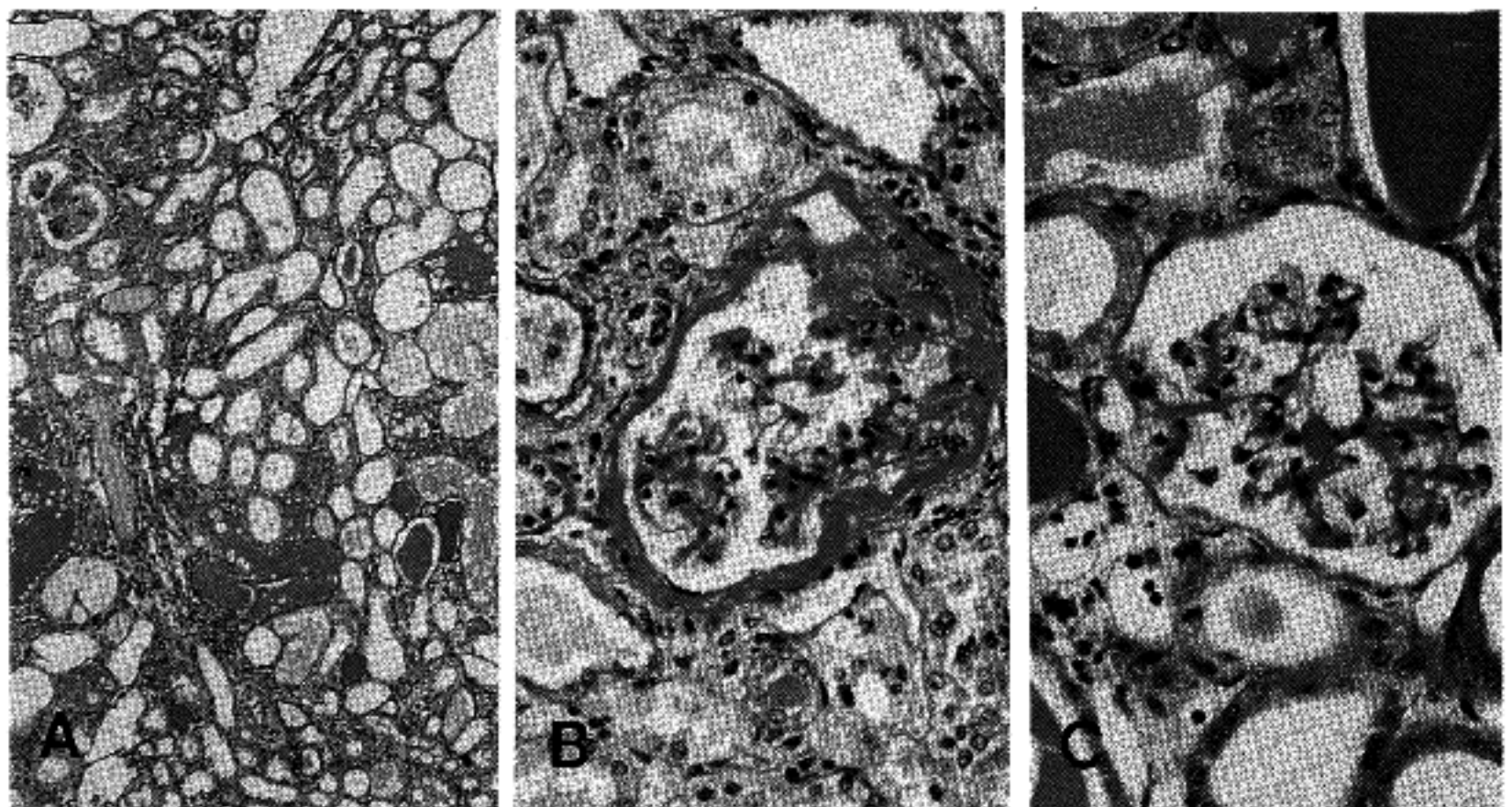


Fig. 4. Renal histopathologic findings of FSG with CsA group. Interstitial mononuclear infiltration is decreased (A, PAS $\times 40$). Segmental sclerosis of glomerulus (B, PAS $\times 200$), and collapse of capillary loops (C, PAS $\times 200$) are seen.

투여에 의하여(IVb군) 유의있게 감소하였다($p < 0.001$). 반면 사구체모세혈관의 허탈은 CsA투여에 의하여 IIIb군에 비하여 더욱 증가하였다(Fig 4). 메산지움세포의 증식은 28실험일에는 IIIb군에서 더욱 심하였으나 56실험일에는 IVb군에서 IIIb군에 비해 증가하였다. 신간질의 단백구침윤은 IIIb군에서 빈번하였으며 이는 CSA의 투여에 의하여 감소하였다. 신수질의 미세석회화가 CSA투여군(IIIb, IVb군)에서 관찰되었다(Table 8).

3) 미세변화신증유발군의 신장의 초미세구조적 변화: MCN유발에 CsA를 투여한 군(IVa군)과 MCN유

발군(IIIa군)을 비교하였을때 족돌기의 소실과 미세음모전환의 정도에 있어 의미있는 차이는 없었다. 또한 IIIa군에서는 일부의 족세포의 국소적 탈락, 공포성 변성, 세포질내 전자고밀도과립이 관찰되었으나(Fig. 5A) IVa군에서는 족세포의 국소적 탈락은 없었고 공포성 변성도 감소하였다(Table 9). IVa군의 일부에서는 근위세뇨관내의 미토콘드리아의 불규칙한 크기의 팽창이 관찰되었다.

4) 국소성분절성사구체경화증유발백서군의 신장의 초미세구조적 변화: IIIb군에서 족세포의 국소적 탈락이 매우 빈번하였으며 극심한 공포성 변성이 대

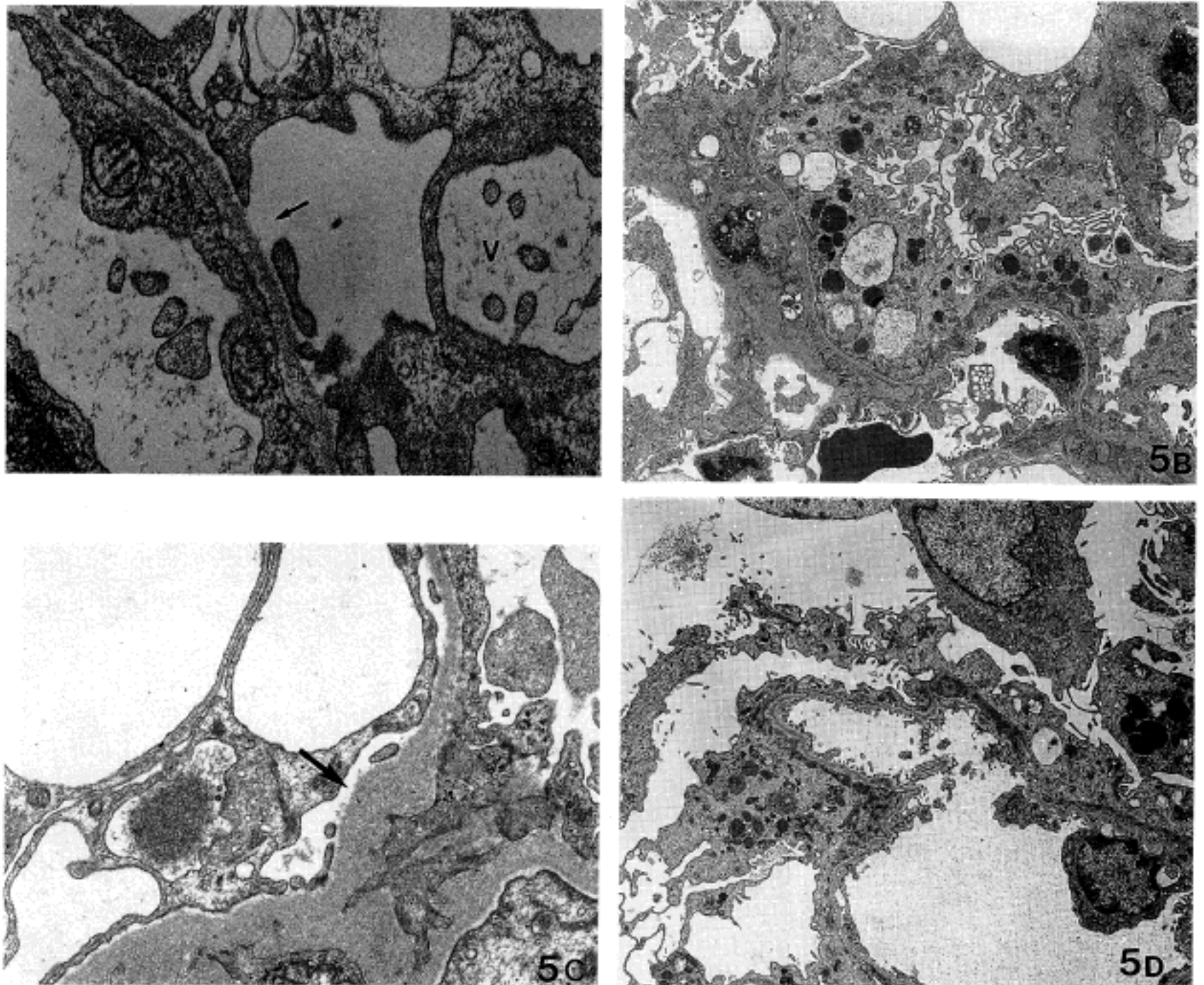


Fig. 5. Ultrastructural findings of renal glomerulus in MCN group (A). Vacuolar degeneration of podocyte (V), and focal detachment (arrow) are noted (A, $\times 40000$). FSG group (B & C). Severe vacuolar degeneration, abundant electron dense granules, marked effacement of foot processes (B, $\times 5100$), and detachment of podocyte (arrow, C, $\times 24000$) are noted. FSG with CsA group (D). Severe effacement of foot processes, microvillous transformation are noted. However vacuolar degeneration is minimal and detachment of podocyte is not seen (D, uranium acetate & lead citrate $\times 5950$).

Table 9. Comparison of ultrastructural changes of glomerulus according to the CsA in MCN rats

| Ultrastructural findings | Ia | IIa | IIIa | IVa |
|--------------------------------------|----|-----|------|-----|
| Effacement of foot process | - | - | + | ± |
| Microvillous transformation | - | - | + | ± |
| Focal detachment of podocytes | - | - | + | - |
| Vacuolar degeneration of podocytes | - | - | + | ± |
| Electron dense granules in podocytes | - | - | ± | - |
| Increase of mesangial matrix | - | - | ± | ± |

Table 10. Comparison of ultrastructural changes of glomerulus according to the CsA in FSG rats

| Ultrastructural findings | Ib | IIb | IIIb | IVb |
|--|----|-----|---------|-----|
| Effacement of foot processes & microvillous transformation | - | - | +++ | +++ |
| Irregularity & thickening of GBM | - | - | + | +++ |
| Detachment of foot processes | - | - | ++ | + |
| Electron dense deposits in podocytes | - | - | +++ | + |
| Vacuolar degeneration | - | - | ++(+++) | + |
| Aggregation of microfilaments in podocytes | - | - | ++ | ++ |
| Increase of mesangial matrix | - | + | +++ | +++ |

Table 11. Comparison of subtype of mononuclear cells according to the CsA in FSG rats

| Mononuclear cells | FSG Group | | FSG + CsA Group | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Glomeruli 28th/56th | Interstitial 28th/56th | Glomeruli 28th/56th | Interstitial 28th/56th |
| T cell | 0.65 ± 0.19/0.44 ± 1.44 | 27.0 ± 2.1/33.6 ± 2.2 | 0.32 ± 0.08/0.40 ± 0.09 | 26.6 ± 1.1/21.8 ± 2.6* |
| B cell | 0.57 ± 0.10/0.54 ± 0.13 | 21.7 ± 6.7/18.3 ± 5.8 | 0.68 ± 0.08/0.75 ± 0.10 | 27.6 ± 2.6/16.8 ± 4.2 |
| Macrophages | 4.32 ± 0.64/6.57 ± 0.50 | 56.2 ± 9.9/47.9 ± 7.4 | 5.28 ± 0.67/4.2 ± 0.35 | 45.6 ± 12.4/62.2 ± 11.3 |

1. Values are given as mean and standard deviation. Values of glomeruli mean positive mononuclear cells/100 glomeruli and interstitium means positive mononuclear cells/100 interstitial mononuclear cells.

2. The proportion of interstitial T cells of CsA administrated group at 56th days is significantly higher than FSG group (p<0.05)

부분의 족세포에서 관찰 되었으며(Fig. 5B, 5C) 이는 CSA의 투여에 의하여 현저히 감소되었다(Fig. 5D). 그외 풍부한 전자고밀도과립, 내피세포와 메산지움 세포의 지방과립의 축적이 IIIb군에서 현저하였으며 이와 같은 변화는 IVb군에서 뚜렷하게 감소하였다. 심한 족돌기의 소실과 미세용모전환은 양군에서 공통히 관찰되었으며 IIIb, IVb의 양군간에는 차이가 없

었다. 반면 사구체기저막의 비후와 불규칙성은 IVb군에서 IIIb군에 비하여 현저하였다(Table 10). 근위 세뇨관의 미세용모의 소실, 세포의 변성, 탈락은 양군 모두에서 흔히 관찰이 되었으며 세포질내 미토콘드리아의 비정상적 팽창과 거대 전자고밀도 리소솜의 축적은 IVb군에서 더 심하였다.

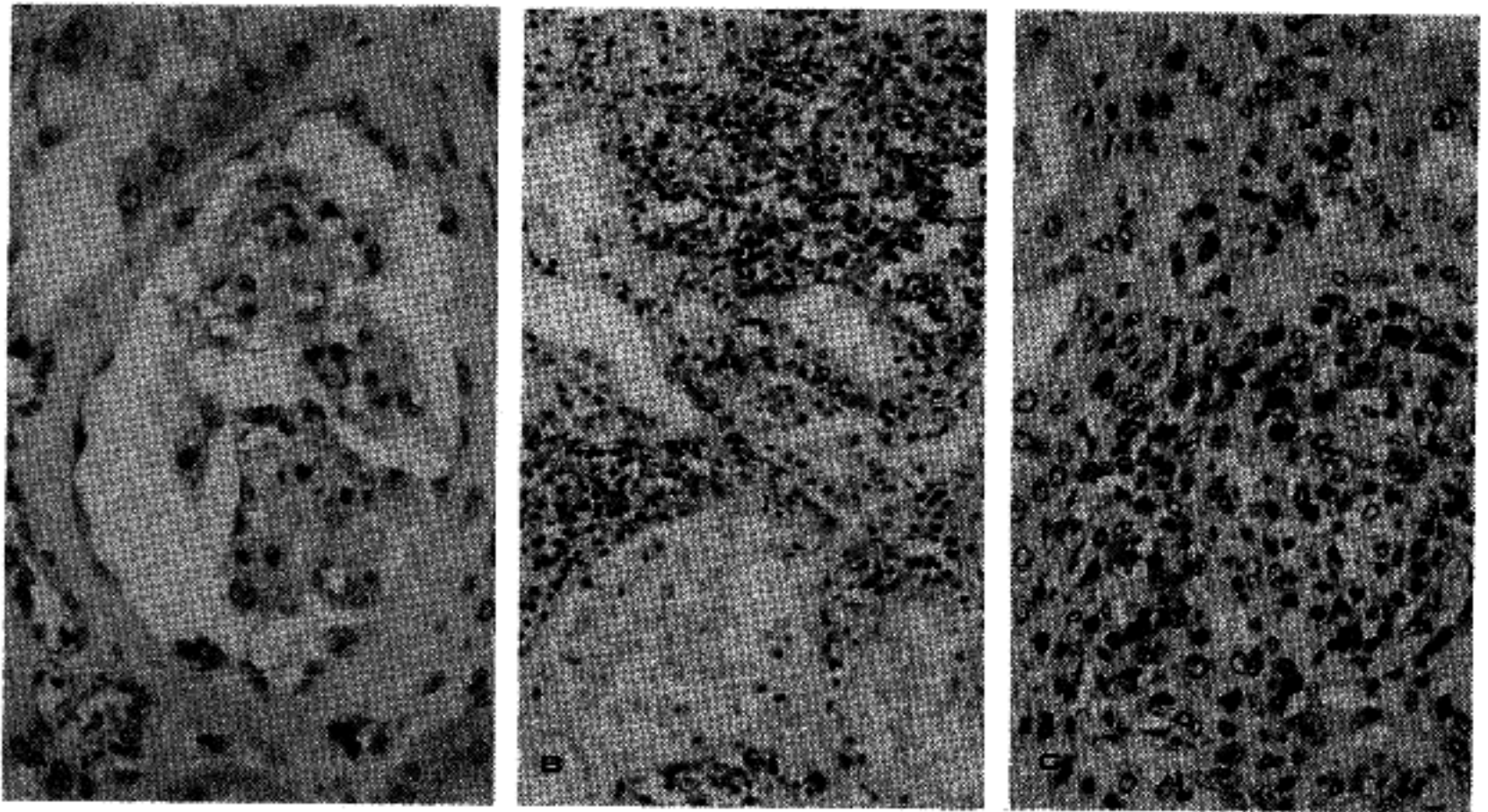


Fig. 6. Immunohistochemical stainings of CD68(A & B), and UCHL-1(C) in FSG groups. A few macrophages(A), and many interstitial mononuclear cells(B) show positivity to CD68 on 28th day. Several UCHL-1 positive T cells (C) are found on 56th day.

5. 신장내 침윤된 단핵구 아형에 대한 면역조직 화학적 연구

국소성분절성사구체경화증 유발군(IIIb군) 및 CsA 투여군(IVb군)에서 사구체에 침윤된 대다수의 단핵구는 CD68항체에 양성을 보이는 탐식구였으며 UCHL 항체에 양성인 T세포와 L26항체에 양성인 B세포는 소수였다. 사구체에 침윤된 단핵구의 아형분포는 두 군간에 의미있는 차이가 없었다(Table 11, Fig. 6). 신장질의 단핵구아형의 분포에 있어서는 28실험일에는 탐식구가 두군 모두에서 가장 많은 비중을 차지하나 56실험일에는 T세포의 비율이 높아지는 경향을 보였다. IVb군의 56실험일새 신장질에 침윤된 T세포는 IIIb군에 비하여 의미있게 저하하였다($p < 0.05$).

고 찰

본 실험에서는 PAN의 투여로 유발된 MCN과 FSG에서 CsA를 투여하여 CsA에 의한 이 두질환에서의 단백뇨의 억제 및 그 기전과 신기능에 미치는 영향, 신장의 경화를 비롯한 병변의 진행과정과 단핵구의 침윤 및 그 아형분포에 미치는 영향등을 비교하고자 하였다. 백서에서 PAN으로 유발한 신증은

약제의 용량, 투여경로, 투여기간에 따라 신사구체 족세포의 가역적 또는 비가역적 변화를 일으켜 단백뇨를 야기시킨다. 즉 체중 100g당 10~15mg의 용량을 1회 정맥 또는 복강내 투여시에는 투여 4일 후부터 단백뇨가 나타나기 시작하며 2~3주에 최고치에 달하여 마치 인체의 비세번화신질환과 유사한 상태가 되고 이러한 변화는 가역적이어서 4주후부터는 정상화된다¹⁰. 그러나 이보다 소량을 반복하여 피하주사시에는 FSG가 유발되는데 이는 신장의 정도에 따라 다양하게 나타난다¹¹. 본 연구에서는 FSG를 유발하기 위하여 PAN을 1mg/체중 100g의 용량을 반복 피하주사하는 방법을 취하였고 혈액동학적인 측면에서 경화를 가중시키기 위하여 약제의 투여 1주전에 일측 신장제를 시행하였다. 실험군중 사망률은 일측 신장제후 PAN을 반복투여한 FSG유발군에서 전반적으로 높았고 이중 CsA를 병용 투여한 군에서 더 높았는데 이는 FSG를 유발시키는 방법자체가 치사율이 높는데 기인하며³⁶ 또한 CsA의 신독성으로 인하여 신기능의 저하가 경화의 변화에 의한 신기능의 저하를 배가시켰기 때문으로 해석된다. CsA를 병용투여중 사망한 동물의 일부의 부검에서 감염의 증가는 관찰되지 않아 면역억제기능이 직접적으로 치사율에 관여하지는 않았으리라 생각

된다.

PAN으로 유발한 MCN 및 FSG에서의 초미세구조적 변화에 대해서는 여러 학자들에 의해 자세히 기술이 되었는데^{1,12,39,40} 초기변화로는 상피세포의 변화가 주종을 이룬다. 즉 족돌기의 소실이 빈번히 관찰되며 이에 더하여 족세포의 공포성 변화, 전자고밀도과립들, 족세포의 기저막으로 부터의 국소적 탈락 등을 공통적으로 관찰하였으며 이중 족세포의 국소적 탈락을 단백뇨의 유발과 직접적으로 관련이 되는 중요한 소견으로 간주하였다^{10-13,41}. 특히 초미세구조적 추적자 기술(trace technique)을 이용하여 이 탈락부위로 부터 주로 단백질이 누출 되며 음이온 ferritin이 누출됨과 다음이온(polyanion)의 소실을 anionic dextran clearance 연구에서도 확인하였다⁴². 본 실험결과에서도 MCN유발군에서 족세포의 국소적 탈락을 일부의 모세혈관고리에서 관찰하였고 이러한 탈락은 FSG유발군에서 탈락의 범위와 정도가 훨씬 심하여 이것이 단백뇨의 정도와 관련이 있으리라 해석되었다. 또 이러한 PAN유발에 의한 상피세포의 변화는 adriamycin으로 유발된 백서의 신증 및 신경화증⁴³과 신증후군을 보이는 환자의 신생검에서도 관찰되며³⁹, Kanwar 및 Rosenzweig¹¹는 헤로인 중독 등 약제나 감염과 관련된 이차성 분절성사구체경화증에서 상피세포의 변성이 원발성 분절성사구체경화증에 비하여 더욱 심한 것을 기술하였다. 상피세포의 변화뿐만이 아니라 사구체기저막의 lamina rara interna, lamina rara externa와 족세포의 slit diaphragm에 존재하여 음이온 전하장벽으로 작용하는 glycosaminoglycan의 주성분인 proteoglycan이나 heparan sulfate와 같은 음이온성분을 PAN이 소실시켜 단백뇨를 야기시킨다는 보고도 있다^{7,9,40,44}. 그러나 trace technique의 결과에 따르면 이 두가지 중요기전으로 거론되고 있는 것이 별개가 아니라 서로 관련됨을 보여준다고 하겠고 그러므로 PAN에 의해 전하선택성과 족세포의 탈락으로 인한 크기선택성의 소실이 모두 단백뇨의 유발에 관여되며 FSG유발군에서는 족세포의 탈락부위가 더욱 심한 단백뇨가 야기되었으리라 생각된다.

Diamond등⁶은 PAN의 투여시의 사구체의 상피세포의 변화가 산소 유리기(O₂ free radical)에 의한 것이라고 결론짓고 그 기전으로 PAN의 대사산물로 hypoxanthine이 생성되고 이는 xanthine oxidase에 의해 superoxide음이온이 생성되기 때문이라 하였다. 또한 superoxide dismutase, catalase, allopurinol등의 산소유리기 제거 및 생성억제물질을 투여하였을때 독성 손상이 완화됨을 확인, 보고하였다⁴⁵. Kawamura

등⁴⁶은 신증후군의 고전적인 치료제인 glucocorticoid가 사구체내 항산화효소를 활성화시켜 산화에 의한 세포손상을 방지하는 것을 확인하였으며 형태학적으로 상피세포의 국소적 탈락, 공포성 변성, 전자고밀도과립을 감소시키는 것을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 Fujiwara⁴⁰가 PAN로 유발한 신증에 steroid를 투여하여 초미세구조적 변화의 측면에서 동일한 감소의 효과가 있음을 관찰하여 보고한 내용과 유관하다.

본 실험에서 관찰된 족세포의 변화중 공포성 변화의 정체와 역할에 대해서는 논의 된바가 없는데 Ryan 및 Karnovsky¹⁰는 단백질의 배설의 통로로 생각하였으나 입증된 바가 없고 저자가 관찰한바에 의하면 내형질세망에서 공포성 변화의 이행단계가 보여 극심하게 변형된 내형질세망으로 생각된다. 한편 족세포질내의 전자고밀도과립의 성분은 재흡수된 단백질과립으로 대부분 해석하였다. 그리고 인체에서나 실험동물에서 단백뇨가 있는 경우 전자현미경적으로 공통적으로 관찰이 되는 것이 족돌기의 소실과 미세음모전환이데 이에 대하여 Abe등⁴⁷ 일부의 학자는 단백뇨의 선행요인이 아니라 단백뇨에 따른 이차적인 결과라 주장하였다. 그러나 PAN투여 후 연속적인 전자현미경적인 관찰시 족돌기의 소실이 단백뇨의 출현에 선행하는 것을 관찰하였고¹⁰, Cohen등⁴⁸은 상피세포의 국소적 탈락도 단백뇨에 선행하여 나타남을 보고하였다. 또한 FSG유발군의 전자현미경 소견에서 내피세포 및 메산지움세포의 비정상적인 지방과립의 축적이 빈번히 관찰되었는데 이는 광학현미경적으로 포말상의 변화와 혈액화학 검사에서의 cholesterol 및 triglyceride의 극심한 증가와 합치되는 것으로⁴⁹ CSA의 투여로 인한 cholesterol 및 triglyceride의 감소가 조직학적으로 이러한 변화의 감소와 부합된다고 하겠다. 이러한 지방과립의 축적은 56실험일째에 28실험일째에 비하여 현저한 것으로 보아 경화의 선행요인이라기 보다는 경화의 진행과 함께 심화된 단백뇨 및 고지질혈증에 따른 이차적인 결과로 생각된다.

CsA는 강력한 면역억제제로 잘 알려져 있으며 장기이식 및 자가면역질환에서 탁월한 거부반응 억제 및 치료효과가 있으나 약제에 의한 부작용 중 신독성이 문제가 되고 있다⁵⁰⁻⁵². 그리고 최근에는 CsA가 신증후군을 일으키는 대표적 질환인 미세변화신질환과 분절성사구체경화증에서 단백뇨를 현저히 억제하는 효과가 밝혀졌고 스테로이드에 잘 반응하지 않는 경우 치료에 시도되고 있다^{30,33,53}. CSA의 면역억제의 작용은 T세포의 기능을 저하시키는 것인데

세부적으로 mitogen과 항원에 의한 T세포의 증식을 방해하며 interleukin-2의 생산, γ interferon의 생산을 저하, 세포독성 T림프구의 생성을 억제시키며 그외에 대식세포와 과립구에 의한 염증반응과 항원공여 세포로서의 기능을 억제시킨다^{37,54,55}. CsA가 신에 미치는 영향으로는 신혈장류량, 사구체여과율의 감소, BUN, creatinine의 증가, 전사구체 백관수축^{56,57}, 고혈압, 고칼슘혈증, 경미한 대사성 산증을 일으킨다. 병리조직학적인 변화로는 소동맥 및 사구체모세혈관의 초자양변화, 사구체의 경화 또는 허탈, 기저막의 비후, 내피세포의 공포성 변화, 세뇨관의 공포성 변화, 함입체, 미세석회화, 위축, 간질의 섬유화⁵⁰ 등인데 이중 대부분은 치료용량의 투여시에는 잘 관찰되지 않으며, 치료용량의 투여시에 관찰될 수 있는 소견으로는 간질의 섬유화, 세뇨관의 위축, 소동맥의 초자양 변화 등이다. CsA에 의한 신독성은 용량의존성이며 가역적인 것으로 알려져 있는데 그 기전으로는 renin-angiotensin-aldosterone체계의 자극, 신장의 prostaglandin대사의 변화, α adrenergic 자극, 신장의 prostaglandin대사의 변화, 사구체-세뇨관 되먹임 기전의 자극에 의한 신장의 혈액학적 변화, 방사구체기구의 증식이 거론되고 있다. 본 실험에서는 CsA 10 mg/kg의 용량을 사용하였는데 이는 인체에서 사용되는 용량이 대개 5 mg/kg임을 감안하면 약간 많은 용량이나 백서에서 단백뇨를 가장 효과적으로 억제할 수 있는 용량이라 할 수 있다³⁶. 또한 본 연구에서는 CsA의 투여군에서 공히 미세석회화가 관찰이 되었고, BUN, creatinine이 FSG군에서는 현저한 증가가, MCN군에서는 경미한 증가가 있었는데 이는 CSA의 기능성 신독성과 관련이 있는 것으로 생각되며 신간질의 미세석회화는 CsA의 작용의 일종인 고칼슘혈증에 의한 이차적인 전이성 칼슘침착으로 사료된다.

한편 CsA에 의한 단백뇨의 억제의 기전에 관해서는 최근에 몇몇 문헌에서 기술되었으나 아직 잘 규명되지 않았고 비특이적인 것으로 알려져 있다³³. Roveva등³⁴은 원발성 신증후군이 T 림프구의 기능의 이상과 관련이 있다고 주장하며 신증후군의 증세가 심한 환자에서 림프구 배양액 상층액에서 $\beta 2$ microglobulin의 수치가 증가됨을 확인하였고 이것이 CsA의 투여에 의하여 감소됨을 보고하였다. Jordan등⁵⁸은 스테로이드저항성 FSG에서 혈청내 interleukin-2치가 증가되고 CsA투여시 관해되나 CsA의 투여중단시 다시 상승함을 관찰하여 미세변화신증후군과 분절성사구체경화증이 T세포의 기능이상과 관련있음을 주장하였다. 이는 면역매개성 사구체질환 및

면역기능의 이상과 직접적인 관련이 있는 원발성 신증후군에서는 CsA의 작용기전으로 잘 설명이 되나⁵⁹, PAN에 의한 신증에서의 단백뇨의 유발은 T림프구와의 직접적인 관련성이 없는 것으로 알려져 있기 때문에 이것으로 단백뇨의 억제와 연관짓기는 어렵다. 또한 PAN에 의한 상피세포의 변성과 단백뇨의 유발기전으로 중요하게 거론되고 있는 음이온부위를 Tanabe³⁵가 polyethylene imine 염색방법으로 관찰하였을 때 CsA의 투여에 의해 음이온의 소실이 방지되어 단백뇨를 억제한다고 주장하였으나 Kokui등³⁶은 음이온부위의 변화와 무관하다고 하여 서로 상반된 결과를 보였다. 한편 Thomson등⁶⁰은 CsA가 사구체의 모세혈관압을 감소시켜 사구체여과율의 감소에 의하여 creatinine의 증가를 보았는데, 이러한 효과도 단백뇨의 감소에 부분적으로 기여하리라 추측하였다. 그러나 본 연구에서 단백뇨의 유발과 직접관련이 되는 것으로 여러 문헌에 의하여 공통적으로 인정된 상피세포의 공포성 변성 및 탈락이 CsA에 의하여 현저히 감소되는 것으로 보아 CsA에 의한 상피세포의 안정화가 단백뇨의 감소와 가장 관련이 크리라 간주된다. 이와 같은 CsA에 의한 상피세포에 대한 효과는 본 실험에 앞서 Wang등³⁷의 연구에서 PAN신증에서 CSA의 투여에 의하여 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase, malon dialdehyde 등의 수치가 증가되었다는 사실과 관련지어 볼 때 스테로이드의 항산화효소의 증가에 의한 족세포의 안정화효과와 일맥상통한다고 하겠다^{40,46}.

본 연구에서 CsA의 투여에 따라서 단백뇨의 탁월한 억제의 효과는 입증된 반면 병리조직학적 관찰에서 사구체의 경화의 정도에는 의미있는 차이가 없었고 허혈성 신손상에 의한 조직학적 변화로 여겨지는 사구체모세혈관의 허탈, 사구체기저막의 불규칙성과 비후는 CsA에 의하여 심화되었는데 이는 CsA에 의한 단백뇨의 감소로 단백질 과부하, 고지질혈증에 의한 내피세포 및 메산지움세포의 손상 및 증식은 억제되어 경화의 가중요인이 완화되었으나 이와는 반대급부로 CsA의 부작용인 허혈성 신손상이 사구체의 경화를 증가시키는 요인으로 작용하여 결과적으로는 사구체의 경화의 정도에는 영향을 미치지 못하는 결과를 빚은 것이 아닌가 추정된다.

또한 이 실험에서 FSG유발군에서 신사구체 및 신간질에서 탐식구의 침윤이 경화의 진행과 함께 증가되었는데 이러한 소견은 일부 학자들에 의해서도 입증된 바이다. 즉 Magil등²⁰은 동맥경화증에서 탐식구의 침윤이 경화의 진행에 주도적 역할을 하듯 인체의 FSG에서 탐식구의 침윤이 사구체 경화의 진행

에 중요하게 관여한다고 하였으며 Diamond등²²은 PAN유발 신증에서 탐식구가 메산지움세포의 증식 및 메산지움기질의 증가에 paracrine 효과로 작용하여 사구체의 손상을 야기하여 FSG로 진행함을 확인하였다. 시간이 경과할수록 이러한 탐식구 뿐만 아니라 신간질에서는 T세포의 비율이 높아졌는데 이는 Hooke¹⁹의 연구결과와 일치한다. T세포의 비율은 또한 CsA의 투여에 의하여 감소하였는데 이는 CsA가 기능적인 측면에서 T세포를 억제할 뿐 아니라 T세포의 증식도 일부 억제하리라 해석된다. 그러나 본 연구에서 CsA의 투여에 의한 T세포의 억제에도 불구하고 사구체의 경화의 정도에는 변화가 없었기 때문에 일찌기 Hooke가 주장한 T세포의 경화의 진행과의 관련은 크지 않으리라 생각된다.

결 론

백서에서 puromycin aminonucleoside를 단기 1회 투여하여 미세변화신증을 일으키고 장기 반복투여하여 국소성분절성사구체경화증을 유발시켜서 cyclosporine A를 투여하여 초미세구조적 변화를 검색함으로써 CsA에 의한 단백뇨 억제기전을 찾고자 하였다. 또한 CsA가 두 질환에서 신의 경화를 비롯한 병리조직학적인 변화와 신장조직내에 침윤된 단백구의 아형분포에 어떤 영향을 미치는지를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

미세변화신증과 국소성분절성사구체경화증에서 모두 현저한 단백뇨가 유발되었으며 이는 CsA의 투여로 인하여 의의있게 감소하였다. 국소성분절성사구체경화증에서는 혈중요소질소와 크레아티닌이 모두 정상에 비하여 증가하였고 이는 또한 CsA의 투여에 의하여 의미있게 심화되었다. 미세변화신증유발군의 초미세구조적 변화로는 족돌기의 소실, 미세음모전환이 일부의 사구체모세혈관고리에서 관찰되었다. 족세포의 국소적 탈락과 세포질의 공포성 변성, 전자고밀도과립이 일부 있었는데 이는 CsA의 투여에 의하여 경감되었다. 국소성분절성사구체경화증 유발군의 초미세구조적 소견으로 족돌기의 소실, 미세음모전환, 족세포의 탈락 및 메산지움의 기질증가가 매우 심화되었으며 족세포 세포질의 극심한 공포성 변성으로 인한 가성 낭종의 형성, 풍부한 거대전자고밀도과립, 미세사의 비정상군집과 빈번한 내피세포, 메산지움세포의 지방성 변성이 관찰되었다. 이중 족세포의 국소적 탈락과 족세포의 극심한 공포성 변화, 전자고밀도과립, 내피세포 및 메산지움세포의 지방성 변성은 CsA의 투여에 의하여 뚜렷히

감소하였다. 반면 기저막의 비후, 불규칙성은 CsA투여군에서 심화되었다. 미세변화신증유발군의 신장조직에서 사구체의 미세경화, 피막부착이 정상에 비하여 의의있게 증가하였으나 CsA투여로 아무런 변화가 없었다. 국소성분절성사구체경화증 유발군에서도 CsA투여에 따른 사구체의 경화의 정도의 차이는 없었다. 반면 사구체내피세포의 포말상 변화, 상피세포증식, 모세혈관의 초자양변화, 신간질의 단백구침윤은 CsA투여에 의해 의의있게 감소하였고 사구체 모세혈관의 협착과 신간질의 섬유화는 CsA투여로 증가하였다. CsA를 투여한 군에서는 공통적으로 신간질의 미세석회화가 관찰되었다. 국소성분절성사구체경화증 유발군의 단백구아형은 사구체와 신간질 모두 탐식구가 주종이었으나 시간의 경과에 따라 신간질에서 T세포의 비율이 높아졌으며 CsA의 투여에 의하여 T세포의 비율은 의의있게 저하하였다.

이상의 실험결과로 puromycin aminonucleoside로 유발한 미세변화신증과 국소성분절성사구체경화증에서 CsA의 투여로 인한 단백뇨의 감소기전에는 사구체내 족세포의 변성 및 국소적 탈락을 저지하여 족세포를 안정화시키는 작용이 관여될 것으로 사료된다. 그러나 CSA가 사구체의 경화로의 진행의 정도에는 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Andrews PM. A scanning and transmission electron microscopic comparison of puromycin aminonucleoside induced nephrosis to hyperalbuminemia induced proteinuria with emphasis on kidney podocyte pedicel loss. *Lab Invest* 1977; 36: 183-97.
2. Karihara H, Anderson JM, Kerjaschki D, Farguhar MG. The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein 20-1. *Am J Pathol* 1992; 141: 805-16.
3. Glasser RJ, Verosa JA, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis I relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977; 36: 519-26.
4. Hoyer JR. Focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 1982; 2: 253-63.
5. Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int* 1987; 32: 691-9.
6. Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous

- dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol* 1986; 122: 481-7.
7. Lelongt B, Makino H, Kanwar YS. Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1987; 31: 1299-310.
 8. Mahan JD, Sisson-Ross S, Vernier RL. Glomerular basement anionic charge site changes early in Aminonucleoside Nephrosis. *Am J Pathol* 1986; 125: 393-401.
 9. Groggel GC, Hovingh P, Border WA, Linder A. Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987; 128: 121-7.
 10. Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of the proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975; 8: 219-32.
 11. Kanwar YS, Rosenzweig LJ. Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium. *Kidney Int* 1982; 21: 565-74.
 12. 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.
 13. Whiteside CI, Cameron R, Munk S, Levy J. Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1993; 142: 1641-53.
 14. Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a sequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 1990; 38: 384-94.
 15. Grond JJ, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 1984; 51: 277-85.
 16. Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E, Eddy AA. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rat. *Am J Pathol* 1992; 141: 1381-96.
 17. Olson JL, Urdaneta AG, Heptinstall RH. Glomerular hyalinosis and its relation to hyperfiltration. *Lab Invest* 1985; 52: 387-98, 1985.
 18. Matsumoto K, Osakabe K, Katayama H, Yoshizawa N, Magura Y, Marada M, Fujita T, Ohi H, Hatano M. Impaired cell mediated immunity in focal glomerular sclerosis. *Nephron* 1983; 34: 220-3.
 19. Hooke DH, Gee DC, Atkins RC. Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1987; 31: 964-72.
 20. Magil AB, Cohen AH. Monocytes and focal glomerulosclerosis. *Lab Invest* 1989; 61: 404-9.
 21. Saito T, Atkins RC. Contribution of mononuclear leukocytes to the progression of experimental focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1990; 37: 1076-83.
 22. Diamond JR, Ding G, Frye J, Diamond IP. Glomerular macrophages and the mesangial proliferative response in the experimental nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 1992; 141: 887-94.
 23. Eddy AA, Michael AF. Acute tubulointerstitial nephritis associated with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1988; 33: 14-23.
 24. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effect of cyclosporine A: A new antilymphocyte agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-75.
 25. Borel JF, Feurer C, Magne C, Stahelin H. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporine A in animals. *Immunology* 1977; 32: 1017-25.
 26. Borel JF. Pharmacology of cyclosporine IV. Pharmacological properties in vivo. *Pharmacol Rev* 1989; 41: 259-371.
 27. Hess AD. Mechanisms of actions of cyclosporine: Considerations for the treatment of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 220-8.
 28. Kahan BD. Cyclosporine. *N Eng J Med* 1989; 21: 1725-38.
 29. Meyrier A. Treatment of glomerular disease with cyclosporine A. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4: 923-7.
 30. Niaudet P, Broyer M, Habib R. Treatment of idiopathic nephrotic syndrome with cyclosporine A in children. *Clin Nephrol* 1991; 35(Suppl): 1-12.
 31. 김병길, 윤수경, 배기수, 최인준, 구자훈, 고철우. 소아 미세변화신증후군에서의 Cyclosporin A의 치료 효과. *대한신장학회지* 1993; 12: 549-56.
 32. Ponticelli C, Rizzoni G, Edefonti A. A randomized trial of cyclosporine in steroid resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1993; 43: 1377-84.
 33. Meyrier A. Treatment of nephrotic syndrome with cyclosporine A. What remains in 1994. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 596-8.
 34. Robeva R, Heslan JM, Branellec A, Laurent J, Lagrue G. Enhanced β 2-microglobulin levels in lymphocyte culture supernatants from patients with idiopathic nephrotic syndrome: inhibition of lymphocyte activation by cyclosporine. *Clin Nephrol* 1988; 30: 211-5.
 35. Tanabe T. Mechanism of reduction in proteinuria by Cyclosporine A: Effects on the glomerular anionic sites. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1990; 65: 377-83.
 36. Kokui K, Yoshikawa N, Nakamura H, Itoh H. Cyclosporin reduces proteinuria in rats with aminonucleoside nephrosis. *J Pathol* 1992; 166: 297-301.
 37. Wang JS, Yang AH, Chen SM, Young TK, Chiang

- H, Liu HC. Amelioration of antioxidant enzyme suppression and proteinuria in cyclosporin-treated puromycin nephrosis. *Nephron* 1993; 65: 418-25.
38. 배기수. 백서에서 Puromycin aminonucleoside 유발 국소성 분절성 사구체경화증에서 미세혈관 변화 및 혈관화장제의 효과. 연세의대 학위논문집 1993학년도 제 2학기: 198-215.
 39. Grishman E, Churg J. Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: An electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int* 1975; 7: 11-122.
 40. Fujiwara Y. An ultrastructural study of the effect of the steroid in puromycin aminonucleoside nephrosis rats. *Virch Arch [Pathol Anat]* 1984; 405: 11-24.
 41. Verosa JA, Glasser RJ, Nevins TE, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis. *Lab Invest* 1977; 36: 527-34.
 42. Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam M. Alteration in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Invest* 1981; 44: 271-82.
 43. Fries JW, Sandstorm DJ, Meyer TW, Rennke HG. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rats. *Lab Invest* 1989; 60: 205-17.
 44. Klein DJ, Dehnel PJ, Oegema TR, Brown DM. Alterations in proteoglycan metabolism in the nephrotic syndrome induced by the Aminonucleoside of puromycin. *Lab Invest* 1984; 50: 543-51.
 45. Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987; 73: 329-32.
 46. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 1991; 40: 291-301.
 47. Abe H, Shibuya T, Odashima S, Arichi S, Nagase S. Alterations in the glomerulus in aminonucleoside nephrosis in analbuminemic rats. *Nephron* 1988; 50: 351-5.
 48. Cohen AH, Mampaso F, Zamboni LZ. Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1977; 37: 30-42.
 49. 김문재. 백서에서 puromycin aminonucleoside 유발 국소성분절성사구체경화증에 미치는 Lovastatin의 효과. 연세의대 학위논문집 1991학년도 제 1학기: 14-27.
 50. Mihatsch MJ, Antonovych T, Bohman SO, Habib R, Helmchen U, Noel LH, Sibley RK, Kemeny E, Feutren G. Cyclosporin A nephropathy: standardization of the evaluation of kidney biopsies. *Clin Nephrol* 1994; 41: 23-32.
 51. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1988; 3: 759-71.
 52. Habib R, Niaudet P. Comparison between pre- and posttreatment renal biopsies in children receiving cyclosporine for idiopathic nephrosis. *Clin Nephrol* 1994; 42: 141-6.
 53. Collaborative Study Group of Sandimmun in Nephrotic Syndrome: Safety and tolerability of cyclosporine A(Sandimmun) in idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 1991; 35(Suppl): 48-56.
 54. Hess AD, Tutschka PJ, Santos GW. Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. *J Immunol* 1981; 126: 961-8.
 55. Reis GD, Shevach EM. Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro: The mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J Immunol* 1982; 129: 2360-67.
 56. Chapman JR, Griffiths D, Harding NGL, Morris PJ. Reversibility of cyclosporin nephrotoxicity after 3 months treatment. *Lancet* 1985; 1: 128-30.
 57. Barros EJC, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987; 32: 19-25.
 58. Jordan SC, Querfeld U, Toyoda M. Serum interleukin-2 levels in a patient with focal segmental glomerulosclerosis. Relationship to clinical course and cyclosporin A therapy. *Pediatr Nephrol* 1990; 4: 166-8.
 59. Thaiss F, Schoeppe W, Willaredet-Stoll JG. Cyclosporin A prevents proteinuria in an active model of membranous nephropathy in rats. *Lab Invest* 1989; 61: 661-9.
 60. Thomson SL, Tucker BJ, Gabbai F, Blantz RL. Functional effects on glomerular hemodynamics of short term chronic cyclosporine A in male rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 960-9.
 61. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986; 29: 478-83.