

## 사구체 질환에서 기저막 음이온부위의 변화

계명대의 병리학교실, 내과학교실\* 및 경북의대 병리학교실\*\*

강유나 · 박관규 · 김승필 · 박성배\*  
김현철\* · 장은숙 · 서인수\*\*

### An Anion Site Change of the Glomerular Basement Membrane on Various Glomerular Diseases

Yu Na Kang, M.D., Kwan Kyu Park, M.D., Seung Pil Kim, M.S.  
Sung Bae Park, M.D., Hyun Chul Kim, M.D.\*, Eun Sook Chang, M.D.  
and In Soo Suh, M.D.\*\*

Department of Pathology and Internal Medicine\*, Keimyung University School of Medicine  
and Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine\*\*

We studied the ultrastructural alteration of glomerular anionic sites in 6 patients with minimal change nephrotic syndrome, 5 patients with membranous glomerulonephritis, 4 patients with focal segmental glomerulosclerosis, and 4 patients with IgA nephropathy by staining with polyethyleneimine (PEI) as a cationic probe. The control study was examined by using a nephrectomy specimen of non-glomerular disease which had no proteinuria. This method seems to selectively stain heparan sulphate in the basement membranes and has been widely used to evaluate changes in basement membrane charge in various human diseases as well as in experimental studies. The anionic sites in the lamina rara interna and lamina densa of normal glomerular basement membrane were always less numerous and less regularly distributed than those in the lamina rara externa. Characteristic common findings in these glomeruli showed a marked decrease of glomerular anionic sites in the regions with immune-complex deposits and normal distribution in the regions with focally those being absorbed and newly forming glomerular basement membrane. They were not detected in the gap of the basement membrane and on the area of the detached overlying epithelium using the PEI method. But the foot process fusion of epithelial cells seems not to influence the loss of anionic sites on the glomerular basement membrane. (Korean J Pathol 1997; 31: 765~772)

**Key Words:** Anionic site, Polyethyleneimine (PEI), Glomerular disease, Ultrastructure, Basement membrane

## 서 론

사구체 기저막은 치밀한 중간층인 치밀판(lamina densa), 두층의 얇고 전자밀도가 낮은 사구체 내측판(lamina rara interna) 및 사구체 외측판(lamina rara externa)으로 구성되어 있다. 또한 사구체 기저막은 혈장 투과작용에 있어서 크기와 전하장벽의 두가지 기능을 가지는데, 특히 사구체에서의 음이온 부위는 기저막에 존재하는 heparan sulfate가 풍부한 proteoglycan과 상피세포 표면에 존재하는 sialoprotein으로 구성되어 있으며 이들 음이온 부위는 혈장 단백질 분자의 사구체 여과에 대해 선택적인 전하장벽으로 작용한다<sup>1,2</sup>.

사구체에서의 음이온 부위는 양이온 전하물질중 하나인 polyethyleneimine(PEI)을 사용하여 초미세구조를 관찰함으로써 알 수 있다. 인체에서 음이온 부위의 소실은 미소변화형 신증후군<sup>3</sup> 및 선천성 신증후군<sup>4</sup>에서 보고되고 있으며, 최근 특발성 막성 사구체신염<sup>5</sup> 및 IgA 신병증<sup>6</sup>에서도 보고되고 있다. 또한 Kanwar등<sup>7</sup>, Rosenzweig등<sup>8</sup>은 동물실험에서 양이온 전하 입자의 투여로 사구체 기저막의 전하를 중성화시키거나, 효소소화로 heparan sulfate를 제거하면 ferritin, catalase 그리고 albumin 등의 음전하를 띤 혈장내 단백질이 사구체를 투과하는 것으로 보아 단백질이 음이온의 소실과 상관관계가 있음을 밝힌 바 있다. 그러나 Peter등<sup>9</sup>은 인간의 다양한 사구체 질환의 단백질은 기저막의 음이온소실의 정도에 상관없이 발생한다고 하였다.

저자는 이러한 기저막에서의 음이온부위의 소실이 어떠한 경우에 초래되는지, 어떤 종류의 사구체 질환과 관계가 있는지, 아니면 기저막의 파괴나 면역복합체의 침착등의 구조적 이상과 관계 있는지를 규명하기 위하여 인체의 신생검을 통한 다양한 사구체 질환을 대상으로 본실험을 계획하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험대상

1994년 동산의료원에서 시행된 신세침검사(needle biopsy)중에서 임의로 선택된 19예를 대상으로 하였다. 실험군은 전예에서 hematoxylin & eosin, Masson's trichrome, silver염색 등의 광학현미경적 검색과 면역형광현미경적 검색 및 전자현미경적 검색 등의 조직학적 검사와 24시간 뇨단백 검사를 실시하였으며,

그결과 미소변화형 신증후군 6예, 초점성 분절형 신사구체 경화증 4예, 막성 사구체 신염 5예 및 IgA 신병증 4예였다. 대조군으로는 비사구체성 질환으로 적출된 신조직을 이용하였다.

### 2. 음이온 부위의 투과전자현미경적 관찰

Okada등<sup>10</sup>의 방법에 따라 0.5 mm<sup>3</sup>로 세절된 신장 조직을 1~4°C에서 8.5% sucrose를 포함하는 0.5% polyethyleneimine(PEI) 용액(Sigma, U.S.A., pH 7.4, MW 50,000)에 30분간 담근 후 역시 8.5% sucrose를 함유하는 0.1 M 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 0.1 M cacodylate 완충용액에 10분간씩 3회 세척하였다. 다음에 실온에서 0.1 M cacodylate 완충용액으로 만든 2% OsO<sub>4</sub> 용액에 2시간 후고정 시킨 후 계열 에탄올로 탈수시키고 epon 혼합물에 포매한 후 투과전자현미경적

Table 1. Clinical data of experimental group

| Case | Age | Sex | 24 hr total urine protein (g/24 hr) | Diagnosis       |
|------|-----|-----|-------------------------------------|-----------------|
| 1    | 20  | M   | 6.0                                 | MCNS            |
| 2    | 16  | F   | 4.0                                 | Ig Anephropathy |
| 3    | 35  | F   | 6.2                                 | IgA nephropathy |
| 4    | 21  | F   | 7.2                                 | FSGS            |
| 5    | 21  | F   | 3.0                                 | MCNS            |
| 6    | 30  | F   | 6.3                                 | FSGS            |
| 7    | 17  | M   | 5.4                                 | MCNS            |
| 8    | 56  | M   | 6.0                                 | MCNS            |
| 9    | 47  | M   | 8.6                                 | MCNS            |
| 10   | 43  | M   | 3.2                                 | MGN             |
| 11   | 33  | M   | 11.0                                | FSGS            |
| 12   | 34  | F   | 3.0                                 | MGN             |
| 13   | 29  | M   | 13.2                                | MCNS            |
| 14   | 40  | F   | 3.9                                 | FSGS            |
| 15   | 42  | M   | 8.3                                 | MGN             |
| 16   | 59  | M   | 7.4                                 | MGN             |
| 17   | 56  | M   | 5.6                                 | MCNS            |
| 18   | 47  | M   | 2.8                                 | IgA nephropathy |
| 19   | 56  | M   | 3.0                                 | IgA nephropathy |

MCNS: minimal change nephrotic syndrome, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, MGN: membranous glomerulonephritis

관찰을 위한 통상적인 과정을 거쳐 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시한 후 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

명 여자 7명이었으며 전 예에서 24시간 단백뇨가 검출되었다(Table 1).

## 결 과

1. 환자의 나이는 16세에서 59세였고, 남자 12

## 2. 음이온 부위의 전자현미경적 소견

대조군의 사구체에서 음이온 부위는 기저막을 따라 분포하는데 기저막 외측판에는 비교적 PEI입자

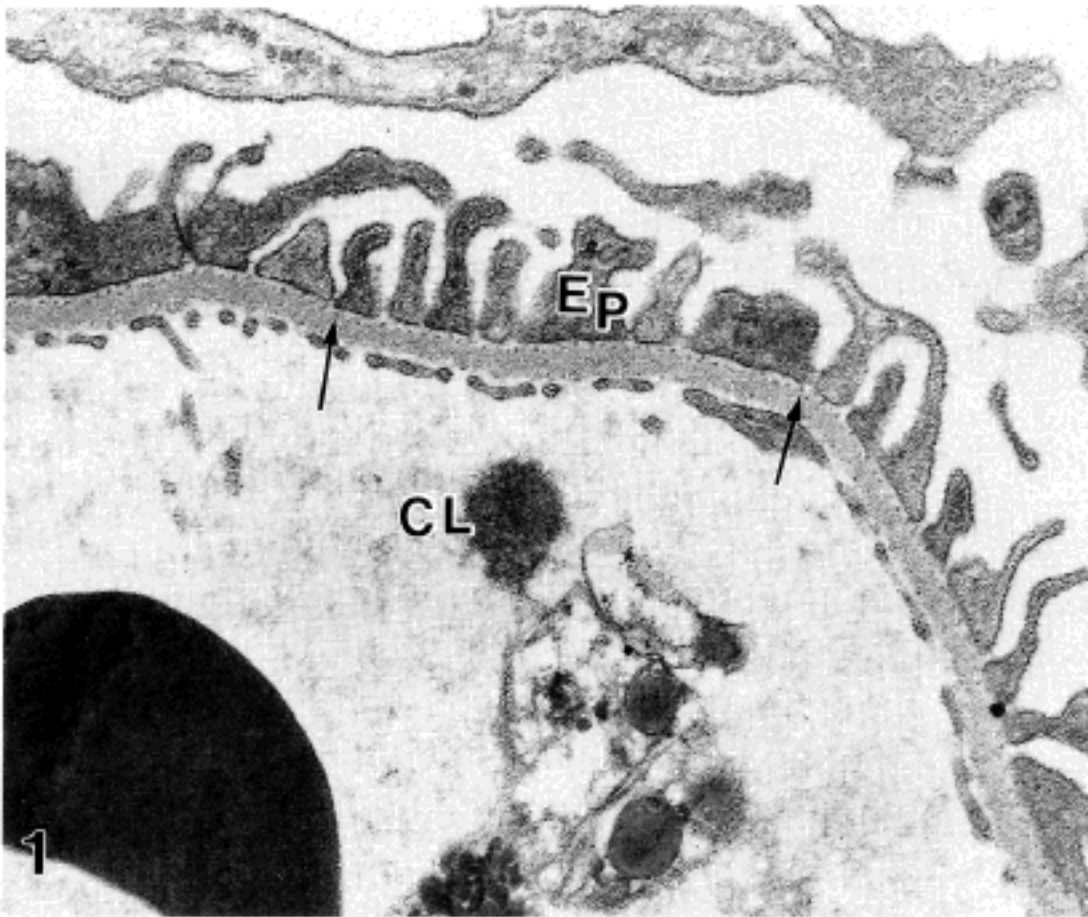


Fig. 1. Distribution of the anionic sites(arrows) in control human glomerulus. Numerous anionic sites are present in the lamina rara externa and epithelial surface coat ( $\times 20,400$ ). Ep: epithelial cell, CL: capillary lumen.

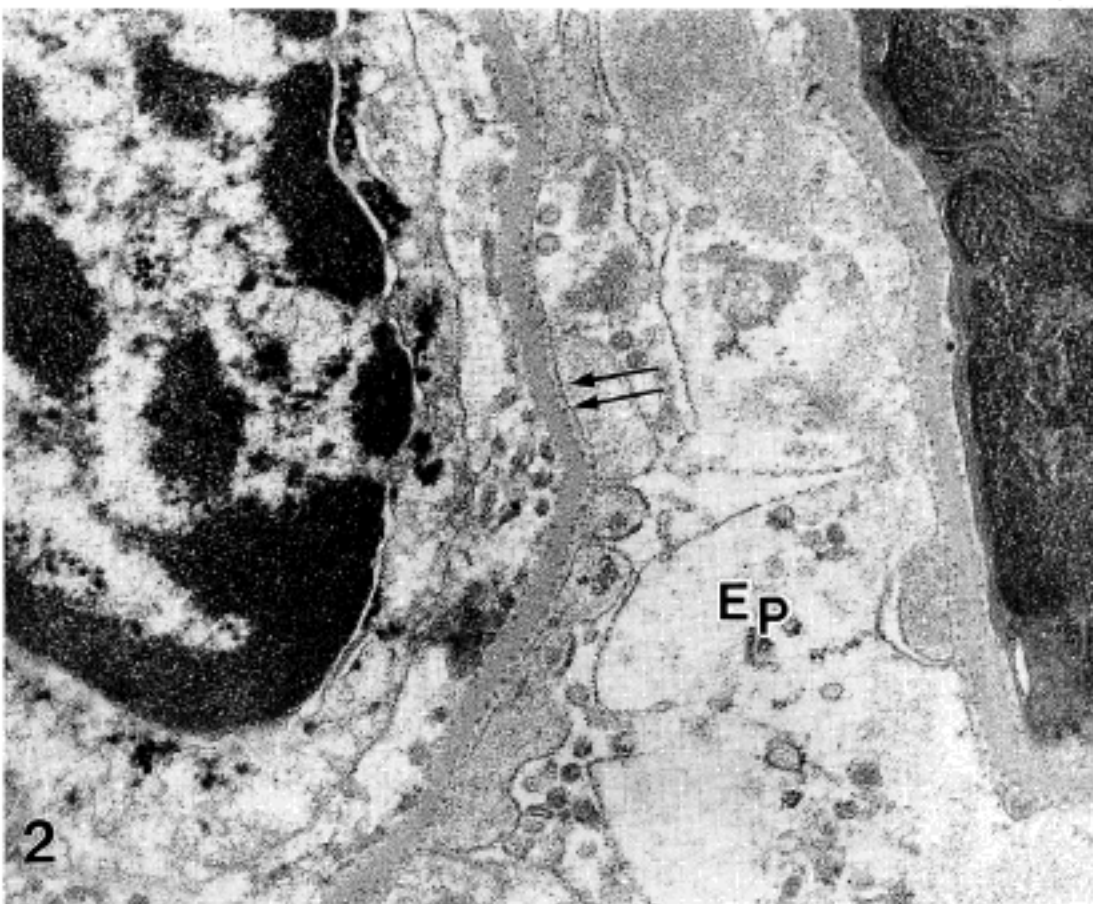


Fig. 2. Control human glomerulus. Lamina rara externa of the GBM has a regular array of electron-dense anionic sites(double arrow). Less regularly distributed sites(arrow) are present within the lamina rara interna, and smaller sites are distributed randomly over the lamina densa of glomerular basement membrane( $\times 28,900$ ).

가 크며 규칙적으로 분포하였고, 기저막 내측판에는 입자의 크기가 기저막 외측판의 그것과 비슷하나 불규칙적으로 분포하였고, 치밀판에는 PEI입자 크기가 매우 작게 산재되어 있었다(Fig. 1, 2). 또한 상피세포 표면의 PEI입자도 규칙적인 분포를 하고 있었다(Fig. 1).

미소변화형 신증후군때 기저막 외측판의 음이온

부위는 기저막의 대부분에서 족돌기의 융합이 있더라도 대조군과 마찬가지로 정상적인 분포를 이루었으나(Fig. 3) 국소적으로 소실된 부위가 관찰되었다(Fig. 4). 기저막 내측판 역시 음이온의 수가 약간 감소할 뿐 거의 정상적 형태를 유지하고 있었다. 또한 상피세포 표면의 입자도 역시 뚜렷하였다. 이것은 주위 상피세포 족돌기의 융합에 관계없이 소실

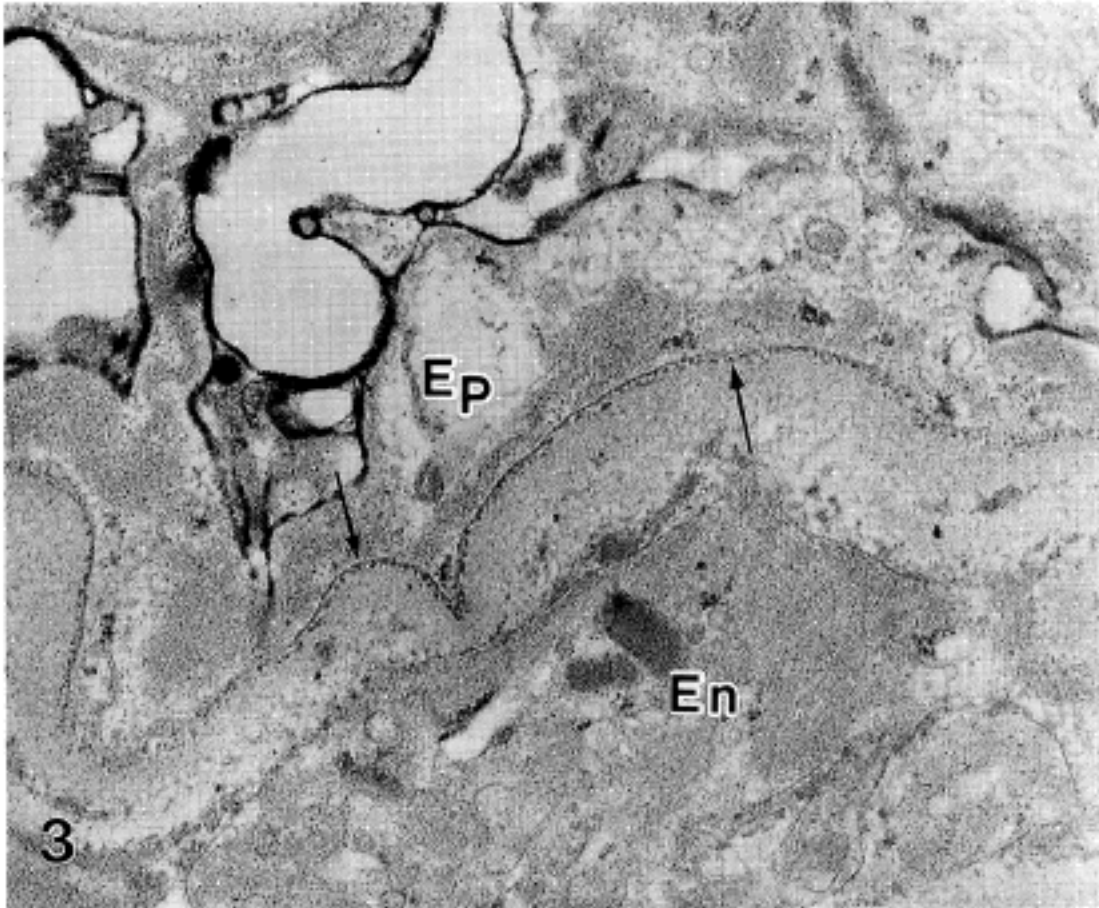


Fig. 3. Minimal change. The distribution of anionic sites (arrow) in the lamina rara externa are not changed. The epithelial cell shows extensive foot process fusion( $\times 28,900$ ). En: Endothelial cell.



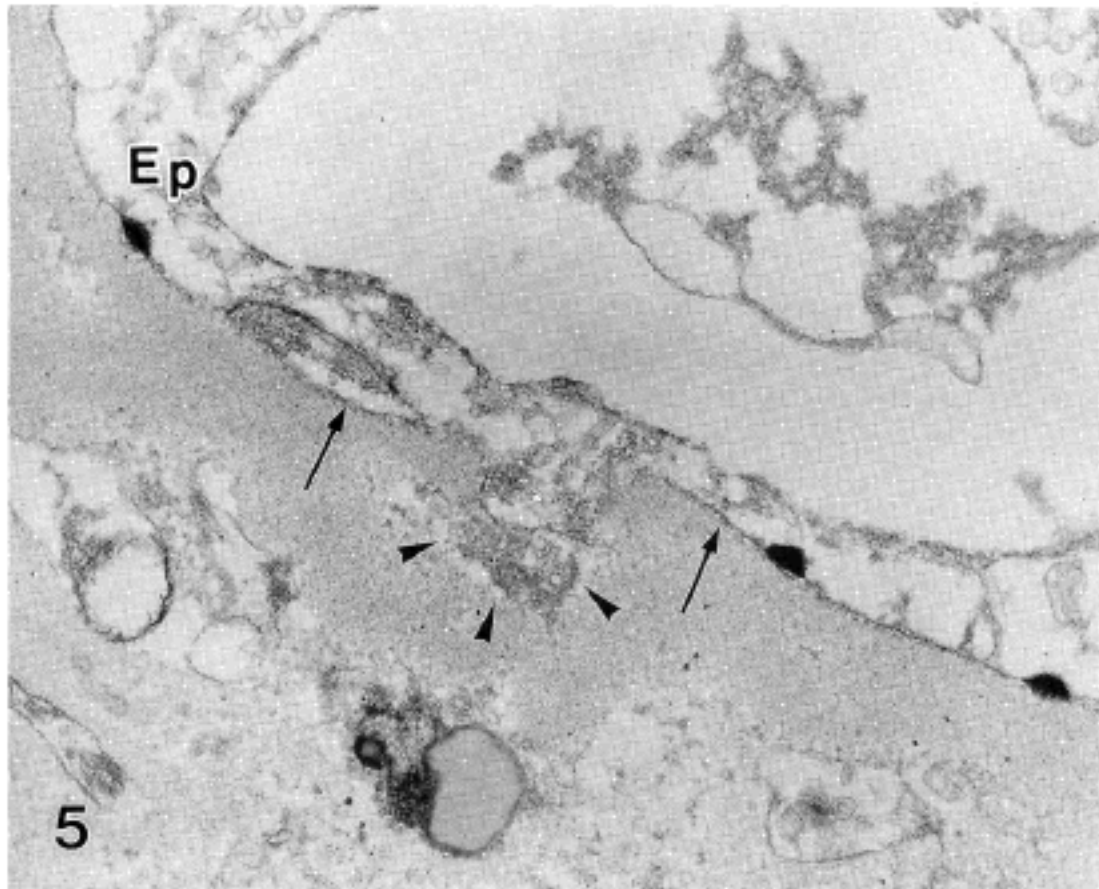
Fig. 4. Minimal change. GBM shows focal loss (arrow heads) of anionic sites (arrow) in the lamina rara externa ( $\times 25,500$ ).

되거나 존재하였다. 그러나 기저막에 틈(gap)이 있을 경우나 상피세포와의 사이에 간격이 생겼을 경우는 음이온의 부위가 소실되었다(Fig. 5).

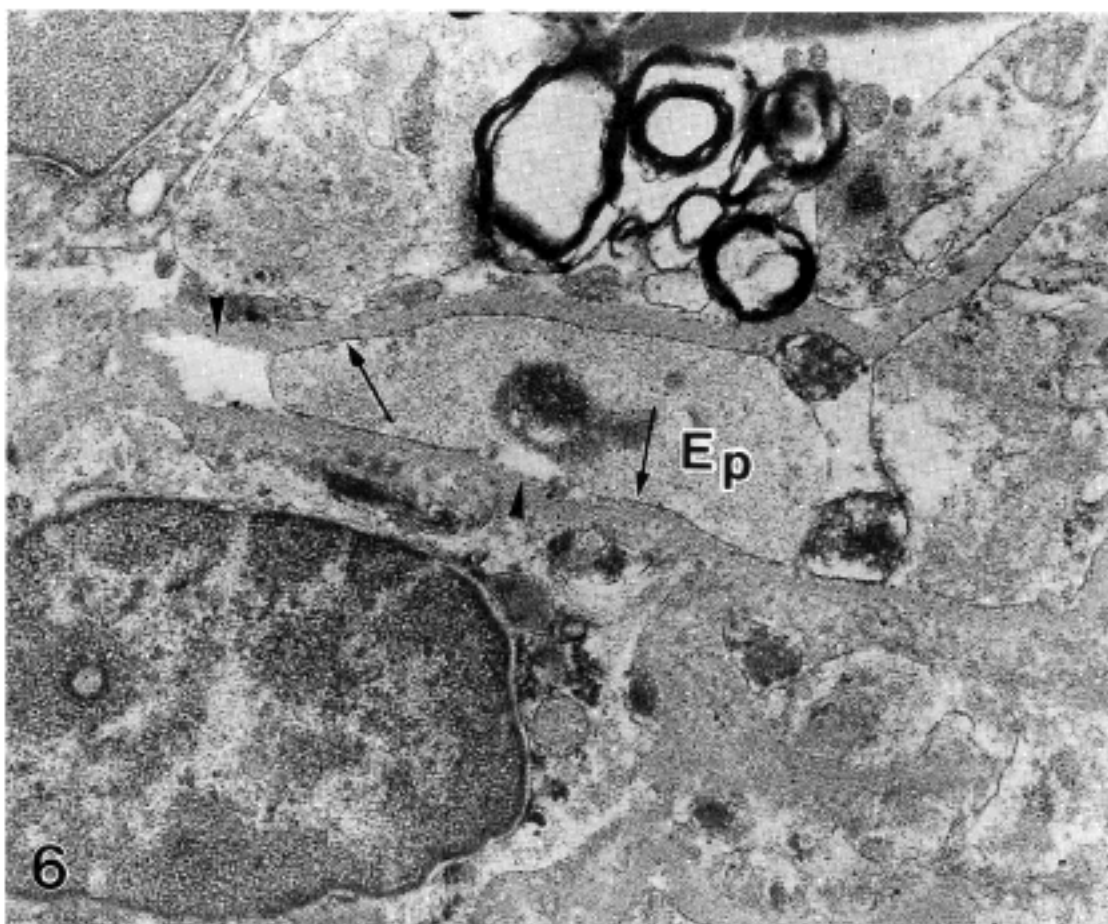
초점성 분절형 신사구체 경화증때의 모든 기저막에서의 음이온 부위는 미소변화형 신증후군때와 동일하였다. 그러나 부분적으로 상피세포가 기저막과

분리된 부분에서는 음이온의 부위가 소실되어 주위 정상적인 음이온의 배열과 구분되었다(Fig. 6).

막성 사구체 신염때는 기저막 외측판의 음이온 부위가 역시 기저막 내측판보다 더 규칙적으로 사구체 기저막을 따라 분포하였고 면역 복합체가 침착된 부위의 기저막에서는 음이온 부위가 소실됨을



**Fig. 5.** Minimal change. GBM shows a gap with loss (arrow heads) of anionic sites (arrows) ( $\times 28,900$ ).



**Fig. 6.** Focal segmental glomerulosclerosis. GBM shows focal loss (arrow head) of anionic sites (arrows) associated with focal detachment of overlying epithelial cells ( $\times 25,500$ ).

관찰할 수 있었다(Fig. 7). 또한 기저막내에서 면역복합체가 흡수되어 생긴 여백주위에 재생된 기저막 외층에서는 새로운 음이온 부위를 뚜렷이 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

IgA 신병증때는 사구체 기저막 음이온 부위는 정상적으로 기저막을 따라 분포하고, 사구체 간질의

음이온 부위는 매우 불규칙적으로 기저막 주위에 분포되어 있었다. 즉 면역복합체가 침착되지 않은 부위의 음이온은 대조군과 유사하게 분포하고, 면역복합체가 침착된 부위에서는 음이온 부위가 사구체 기저막 및 사구체 백관 부위 모두에서 대조군에 비해 현저한 감소가 관찰되었다.

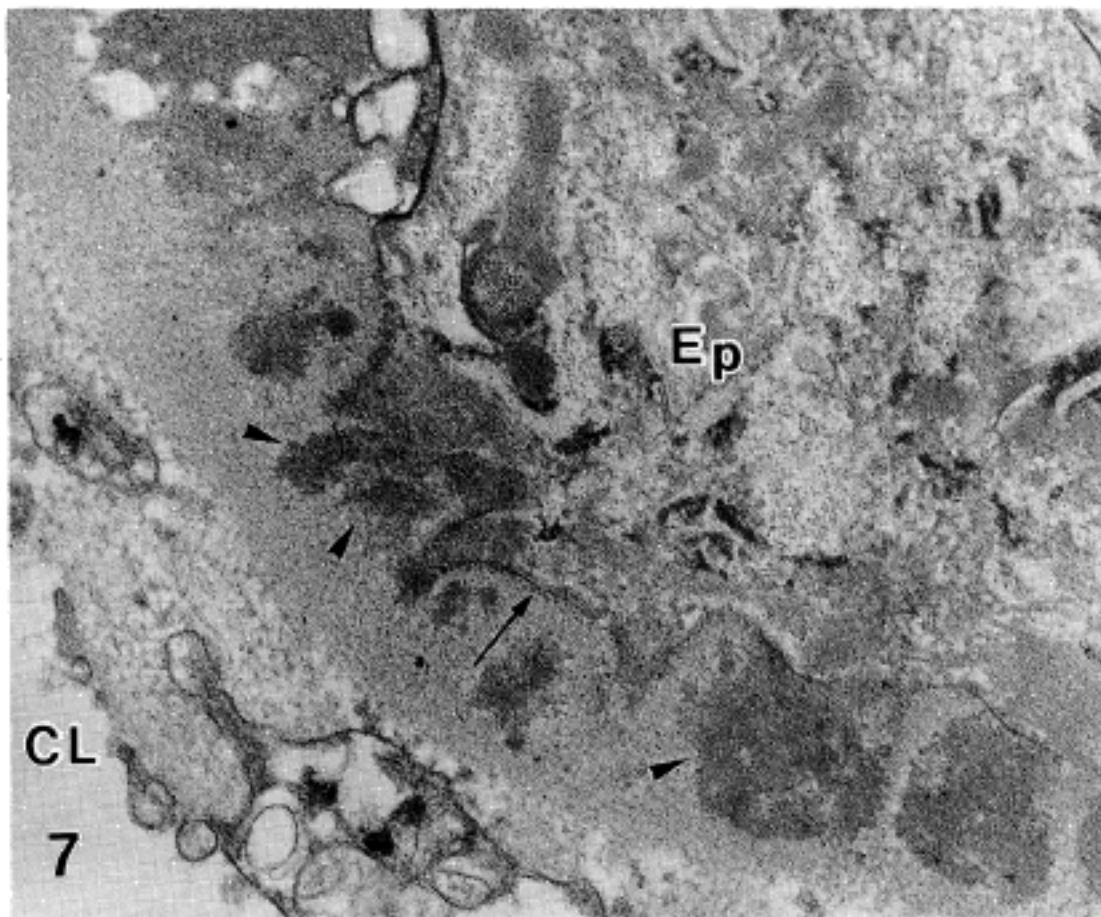


Fig. 7. Membranous glomerulonephritis. The subepithelial deposits contain no PEI particle. The anionic sites (arrow) of the lamina rara externa are markedly decreased at the sites of the deposit (arrow heads) ( $\times 28,900$ ). Normal anionic sites: Arrow.

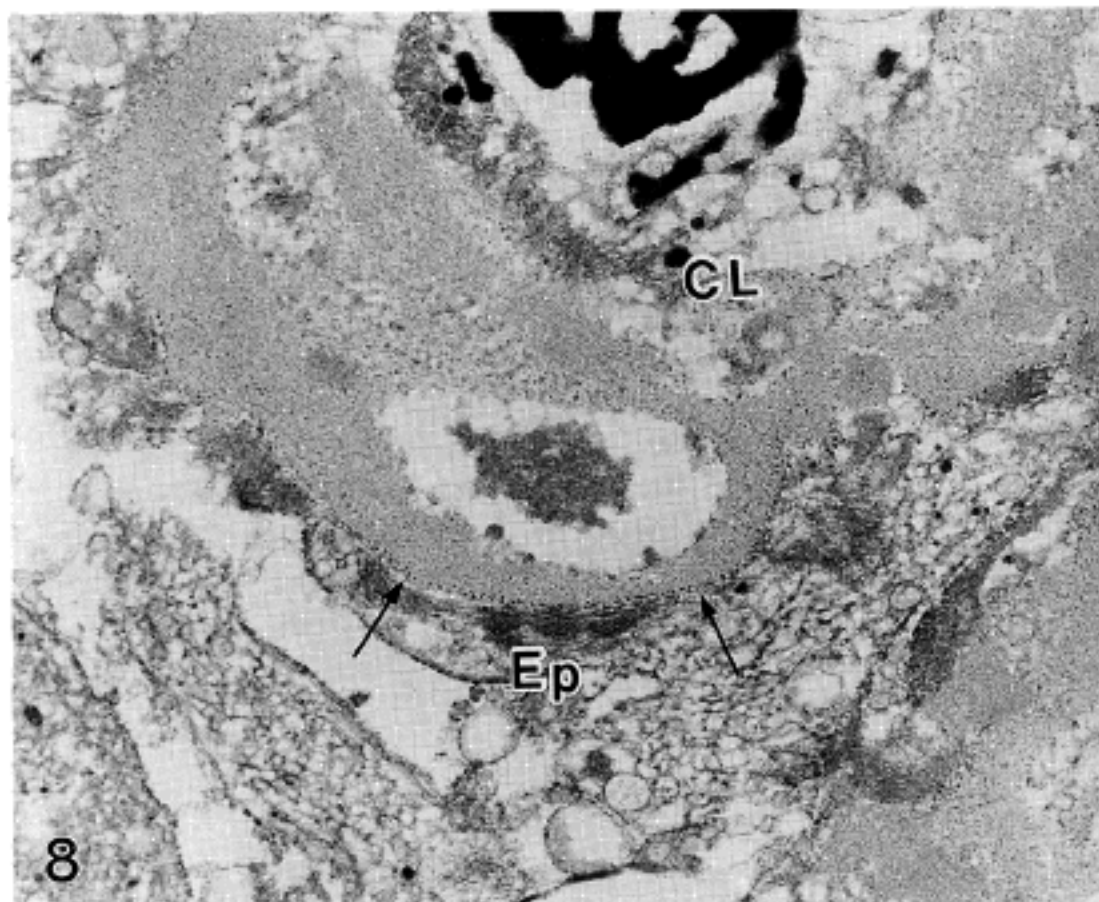


Fig. 8. Membranous glomerulonephritis. An intramembranous deposit is covered with newly formed GBM with normally distributed PEI particles (arrow) ( $\times 20,400$ ).

## 고 찰

Poppenheimer<sup>11</sup>에 의해 정립된 pore theory가 정립된 이래 사구체에서의 음전하의 변화가 단백뇨의 형성에 기여하는 인자로 작용할 것으로 여겨져왔으며 여러 학자들<sup>12-15</sup>에 의해 실험적으로 증명되어 왔다. 신장에서 음이온 부위를 염색하기 위하여 polyethyleneimine(PEI), ruthenium red, alcian blue, cuproinic blue, safranin-O, high iron diamine thiocarbonylhydrazide silver proteinate(HID-TCH-SP) 등이 cationic probe로 사용되어졌으며 이들은 각각 염색부위와 염색된 음이온 부위의 형태가 방법에 따라 다르게 나타난다. 사구체 기저막의 고정 음이온 전하는 heparan sulfate proteoglycan으로 구성되어지며 이것은 음이온을 지닌 혈청 단백질에 대한 중요한 사구체의 선택적 전하장벽으로 생각된다<sup>4,7</sup>. Hiramatsu등<sup>16</sup>은 생쥐의 사구체 기저막에서의 heparan sulfate proteoglycan 위치가 PEI 염색 방법으로 확인된 고정된 음이온 부위와 매우 일치한다고 보고하였다. 그래서 저자들은 PEI를 cationic probe로 사용하는 것이 사구체 기저막에서 고정 음이온 부위 관찰을 위해 적절하다고 생각하였다.

비사구체성 질환으로 적출된 신장 조직을 대상으로 한 실험 대조군에서의 기저막 외측판에는 PEI 입자가 비교적 굵고 규칙적으로 분포해 있었고 기저막 내측판에서는 PEI 입자의 크기는 비슷하나 덜 규칙적으로 분포 되어 있음을 관찰할 수 있었다. 또한 치밀판에는 비교적 작은 크기의 PEI 입자가 산재하여 분포해 있었고 사구체 맥관에는 매우 불규칙하게 산재하여 분포하였다. 대조군에서의 이러한 소견들은 Vernier등<sup>4</sup>의 결과와 일치하였다. 단백뇨를 동반하는 다른 사구체 질환을 관찰한 결과 기저막의 손상이나 틈이 있는 부위와, 상피세포가 기저막으로부터 탈락 또는 분리된 부위에서 사구체 기저막의 음이온 부위가 소실됨을 관찰하였다. 이때 이들 음이온 부위의 소실이 혈장내 음전하를 띤 거대 단백질의 혈관벽 유출을 유발하고 단백뇨를 일으키는 것으로 생각되어진다. Washizawa등<sup>3</sup>은 진행성 신증후군 환자의 사구체 기저막에서 음이온 부위의 소실로 인해 전하장벽의 기능 부전이 초래되고 이로 인해 음전하를 띤 혈장 단백질들이 혈관벽으로부터 유출되고, steroid 혹은 면역억제제 복용으로 단백뇨가 소실된 신증후군 환자의 경우는 음이온이 거의 정상적으로 분포한다고 하였다.

그러나 PEI 염색에 의한 전하결손이 단백뇨와 관련이 있는지에 대해 많은 논란이 있다. 즉 사구체 기저막의 음이온 전하분포가 정상적인 경우에도 단백뇨가 발생하는 반면<sup>5,17</sup>, puromycin 신증의 경우<sup>18</sup>와 같이 초기단계에서도 현저한 음이온 전하의 감소가 관찰되기도 한다. 본 실험에서도 상피세포 죽돌기의 융합이 일어난 부위나 재생된 기저막 부위에서는 음이온 부위의 변화가 없었다. 이것은 Washizawa등<sup>3</sup>이 미소변화형 신증후군에서 밝혔듯이 지속적인 손상이 없이 기저막 손상이 복구된 경우에는 음이온 소실이 다시 정상적 분포를 취하고 단백뇨 역시 소실되나, 새로운 전하층 복구가 비정상이고 효과적인 기능을 다하지 못할 때는 음전하의 소실이 없더라도 대량의 단백뇨가 발생할 가능성이 있다는 것과 일치하는 소견이다. 따라서 단백뇨 발생은 다양한 병리학적 진행의 결과로 추정되고 이 진행과정에서 사구체 기저막 전하의 변화가 단백뇨 형성에 어떠한 역할을 하는지는 아직도 불명치가 않으며 본 실험에서도 음이온 부위의 변화와 단백뇨와의 뚜렷한 상관관계를 밝히기는 힘들었다. 음이온 부위의 변화 없이 발생하는 단백뇨를 설명하기 위해서는 아직 밝혀지지 않는 기전에 대한 보다 많은 연구가 있어야 하겠다.

사구체 맥관과 상피세포하의 면역침착이 있는 부위에서 음이온 부위의 현저한 감소가 관찰되었는데 이는 실험적 모델<sup>19,20</sup>을 통한 연구에서도 음전하를 띤 단백질들이 상피세포하 면역침착이 있는 사구체 기저막 부위를 가로질러 투과하는 것이 관찰되기도 하여 본실험의 결과와 일치한다. 즉 음전하를 띤 단백질들이 음이온이 소실된 부위를 통해 사구체 기저막을 통과한다고 추측할 수 있다.

이상의 문헌고찰과 본 실험의 결과를 종합해 보면 사구체 기저막에서의 음이온 부위의 소실은 크게 두 가지 경우에서 관찰된다. 첫째는 기저막 자체의 변화, 즉 기저막 내의 손상이나 틈이 있을 때 또는 기저막에 붙어있는 상피세포 죽돌기가 탈락되는 경우이며, 둘째는 면역 복합체가 내피하 침착이나 상피하 침착 등 어느 곳이든지 그 부위의 음이온이 소실된다. 상피세포의 죽돌기의 융합 자체는 음이온 부위의 소실과 직접 연관성이 없는 것으로 보이나 이것이 더욱 진행되어 기저막에서 탈락되는 경우에는 음이온 부위의 소실이 동반된다.

## 요 약

저자는 1994년 1년 동안 시행된 신 침생검 중 임

의로 선택된 19예를 대상으로하여 미소변화형 신증후군 6예, 막성 사구체 신염 5예, 초점성 분절형 신사구체 경화증 4예, IgA 신병증 4예를 광학현미경, 면역형광현미경 및 전자현미경적 소견과 polyethyleneimine(PEI)를 사용한 기저막에서의 음이온 부위 변화를 관찰한 뒤 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째 사구체 기저막의 손상이나 틈이 있는 부위는 음이온의 소실이 초래되고 둘째 상피세포가 기저막에서 분리된 경우에서도 음이온이 소실되고 셋째 면역 복합체의 침착 역시 기저막에서의 음이온의 손실을 초래한다. 넷째 일부 흡수되는 면역복합체 주위로 기저막이 재생되는 경우에는 음이온 부위가 존재하고 다섯째 상피세포의 족돌기의 융합은 음이온 부위의 변화를 잘 초래하지 않는다는 것이다.

### 참 고 문 헌

- Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. The molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med* 1978; 298: 826-33.
- Rennke HG, Patel Y, Venkatachalam MA. Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral and cationic horseradish peroxidase in the rat. *Kidney Int* 1978; 13: 278-88.
- Washizawa K, Kasai S, Mori T, Komiyama A, Shigematsu H. Ultrastructural alteration of glomerular anionic sites in nephrotic patients. *Pediatric Nephrology* 1993; 7: 1-5.
- Vernier RL, Klein DJ, Sisson SP, Mahan JD, Oegema TR, Brown DM. Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. *New Engl J Med* 1983; 309: 1001-9.
- Furness PN, Turner DR, Cotton RE. Basement membrane charge in human glomerular disease. *J Pathol* 1986; 150: 267-78.
- Okada K, Kawakami K, Yano I, Funai M, Kagami S, Kuroda Y, Oite T. Ultrastructural alterations of glomerular anionic sites in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1989; 31: 96-102.
- 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* 1980; 86: 688-93.
- Rosenzweig LJ, Kanwar YS. Removal of sulfated (heparan sulfate) or nonsulfated (hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to <sup>125</sup>I bovine serum albumin. *Lab Invest* 1982; 47: 177-84.
- Furness PN, Turner DR, Cotton RE. Basement membrane charge in human glomerular disease. *J Pathol* 1986; 150: 267-78.
- Okada K, Kawakami K, Miyao M, Oite T. Ultrastructural alterations of glomerular anionic sites in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1986; 26: 7-14.
- Poppenheimer JR. Passage of molecules through capillary walls. *Physiol Rev* 1953; 33: 387-423.
- Caulfield JP, Farquhar M. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1978; 39: 505-12.
- Groggel GC, Hovingh P, Border WA, Linker A. Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987; 128: 521-7.
- Mynderse LA, Hassell JR, Kleinmann HK, Martin GR, Hernandez AN. Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rat. *Lab Invest* 1983; 48: 292-302.
- Olsen JL, Rennke HG, Venkatachalam MA. Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Invest* 1981; 44: 271-8.
- 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* 1989; 31: 125-34.
- 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* 1993; 34: 9-16.
- Mahan JD, Sission-Ross S, Vernier RL. Glomerular basement membrane anionic charge site changes early in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1986; 125: 393-401.
- Kelley VE, Cavallo T. Glomerular permeability: Ultrastructural studies in New Zealand black/white mice using polyanionic ferritin as a molecular probe. *Lab Invest* 1977; 37: 265-75.
- Schneeberger EE, O'Brien A, Gruppe WE. Altered glomerular permeability in Munich-Wistar rats with autologous immune complex nephritis. *Lab Invest* 1979; 40: 227-35.