

# FGS/NgaKist 백서신장의 형태학적 및 변환 성장인자- $\beta$ 의 변화

대구효성가톨릭대학교 의과대학 병리학교실 및 <sup>1</sup>한국과학기술원 생명공학연구소 유전자원센터  
<sup>2</sup>경북대학교 의과대학 병리학교실

오훈규 · 김용진 · 박미옥 · 이철호<sup>1</sup> · 현병화<sup>1</sup> · 서인수<sup>2</sup>

## Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ and Morphologic Changes of Glomerulosclerosis in FGS/NgaKist Mouse

Hoon Kyu Oh, Yong Jin Kim, Mi Ok Park, Chul Ho Lee<sup>1</sup>, Byung Hwa Hyun<sup>1</sup>, and In Soo Shu<sup>2</sup>

Department of Pathology, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung  
Genetic Resources Center, Taegu 705-034, Korea

<sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST

<sup>2</sup>Department of Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is presented as not only one of the primary glomerular diseases but also as a secondary phenomenon for chronic irreversible renal diseases. The main pathological feature of FSGS is the accumulation of extracellular matrix in the glomeruli, for which overexpression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) may be responsible for the accumulation of pathological matrix. A new animal model (FGS/NgaKist mouse) of renal failure by spontaneously generating glomerulosclerosis was developed. To elucidate the role of TGF- $\beta$  for FSGS, authors observed glomeruli of FGS/NgaKist mouse periodically. FGS/NgaKist mouse strain showed progression of proteinuria and focal glomerular sclerosis with the aging. The glomeruli showed anti IgG, IgA, IgM and complement complex deposits and extracellular matrix accumulation in the mesangium. TGF- $\beta$  mRNA and  $\beta_2$  antibody expressions were increased with the advance of glomerular sclerosis. The results suggest the following; FSGS of FGS/NgaKist strain is immune mediated disease and this stimuli on mesangial or endothelial cells may activate TGF- $\beta$  gene in their nuclei. This activation, in turn, can cause sclerosis by increasing TGF- $\beta$  mRNA transcription followed by secretion of TGF- $\beta$  and its action as cytokine for making collagen fibrils. (Korean J Pathol 1998; 32: 35~42)

**Key Words:** FGS/NgaKist mouse, FSGS, TGF- $\beta$ , In-situ hybridization

### 서 론

사구체신염 (glomerulonephritis)의 원인은 다양하며 현대에 이르러서도 그 대부분이 신장기능을 점차 상실하여 만성 신부전증 (chronic renal failure)으로 빠진다.

신기능 부전의 형태학적인 변화는 원발성 사구체질환의 종류에 무관하게 이들 질환이 진행함에 따라 사구

체에 국소적으로 경화 (focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)가 시작되어 전체적인 경화 (global sclerosis)로 이어져 사구체 기능의 상실로 나타난다는 것으로 밝혀져 있다.<sup>1~8</sup>

이것은 사구체에 가해진 손상에 대한 치유반응으로서 세포외기질의 침착으로 섬유화가 진행되는 현상이다.<sup>9,10</sup> 이러한 세포외기질의 구성성분은 대부분 교원질이며 그 외에 여러 가지 비교원질성 당단백물질로 이루어져 있다. 이들 세포외기질은 단순한 구조적 지지작용 뿐 아니라 cytokine의 활성을 변화시키고 적응하게 하여 세포의 증식, 이동, 분화에 중요기능을 하며 세포들이 이전에 경험한 손상들을 기억할 수 있도록 도와주는 기

접 수: 1997년 4월 29일, 게재승인: 1997년 10월 9일  
주 소: 대구시 남구 대명 4동 3056-6, 우편번호 705-034  
대구효성가톨릭의과대학병원 해부병리과, 오훈규  
ISSN : 0379-1149

능을 한다. 이런 작용들은 성장촉진인자들에 의해 조절되고 변화되는데 대표적인 인자로서 섬유모세포 성장인자 (fibroblast growth factor, FGF), 혈소판기원 성장인자 (platelet derived growth factor, PDGF), 변환 성장인자 (transforming growth factor, TGF) 등이 있다.<sup>11</sup>

이 중 TGF- $\beta$ 는 신장의 간질조직에서 섬유화의 조절인자로 처음 밝혀진 이후<sup>12</sup> 현재는 우리 인체의 거의 모든 조직을 대상으로 연구되고 있다. 정상신장에서 TGF- $\beta$ 는 세뇨관의 상피세포와 간질조직에서 발현되며<sup>13</sup> IgA 신병증, FSGS, 막성 사구체신병 등 병적 상태의 사구체에서도 발현된다고 한다.<sup>14</sup>

따라서 사구체경화도 TGF- $\beta$ 에 의해 조절될 것으로 생각되고 경화의 초기에서부터 말기까지 순차적으로 형태학적인 변화와 TGF- $\beta$ 의 변화를 관찰하는 것은 사구체경화의 기전을 이해하는데는 물론 치료의 원칙을 정하는데도 중요한 자료가 될 것으로 생각한다.

그러나 지금까지의 FSGS의 실험모델들은 거의 모두가 aminonucleoside,<sup>15-18</sup> adriamycin 등<sup>15,19</sup>의 약물투여나 단백질, 소금 혹은 고지방 식이요법, 부분적인 신적출술,<sup>8,20,21</sup> 그리고 방사선 투여 등 인위적인 상해로서 이러한 실험의 결과로 사람의 FSGS와 유사한 형태학적 변화나 임상결과를 도출하기는 하였으나 사람이 실제 이러한 환경에 노출되기는 거의 불가능하기에 사람의 FSGS와 같다고 보기는 어렵고 또한 상기의 실험적 조건을 제거하면 FSGS가 생기지 않기에 치료법의 개발을 위한 실험모델로도 적합하지 않다고 할 수 있다.

1991년 Hyun 등<sup>22</sup>이 개발한 FGS/NgaKist로 명명된 백서는 생후 2-3개월 이내에 자연발생적으로 사구체경화가 생겨 만성 신부전증으로 사망하는 것으로 되어 있다. 따라서 이 동물모델의 이용이 사람의 FSGS의 병인 및 진행성 신부전증의 연구에 훨씬 유용할 것으로 생각된다.<sup>22-24</sup>

이상의 문헌적 지견을 바탕으로 FGS/NgaKist 백서에서의 점진적인 사구체경화증을 형태학적인 측면에서 관찰하고 TGF- $\beta_2$  항체와 TGF- $\beta$  m-RNA의 발현을 관찰함으로써 사구체경화와 TGF- $\beta$ 의 연관 관계를 알아 보아서 FSGS의 병리기전을 분자생물학적인 측면에서 설명하고 향후 유전자치료법 개발의 기본적인 자료를 제공하기 위하여 본 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

CBA/Nga 백서와 RFM/Nga 백서의 교배에서 만들어진 FGS/NgaKist 백서를 한국과학기술 연구원 부설 생명공학 연구소에서 18마리를 제공받아 플라스틱 쥐장에서 사육하였다. 실험기간중 사료로는 페레트형의 고형 사료를 사용하였고 물은 자유롭게 먹게 하였다.

### 2. 실험과정

실험동물은 무작위로 각각 6마리씩 A, B, C군으로 구

분하여 각각 생후 1, 3, 6개월에 도살하였다.

### 3. 요수집 및 단백뇨 측정

각 실험동물을 2주마다 대사쥐장에 넣고 24시간동안 요를 모아 Lab-stix (Ames)으로 요단백을 측정하였으며 단백뇨의 수치는 0, +1, +2, +3의 등급으로 구분하였다.

### 4. 병리조직학적 검사

1, 3, 6개월 제에 에테르마취 하에 절두하여 양쪽 신장을 적출 하여 한쪽은 반으로 나누어 10% 중성 포르말린과 picric acid가 포함된 Dubosq-Brazil (D-B) 용액에 각각 고정하여 광학현미경검사에 사용하고 나머지 한쪽은 반으로 나누어서 각각 전자현미경검사와 면역형광검사에 사용하였다.

1) 광학현미경 검사: 10% 중성 포르말린과 D-B용액에 고정한 조직을 파라핀 포매후 4 $\mu$ m 두께로 박절후 periodic acid-schiff (PAS)염색을 시행하였다.

사구체경화는 분엽성의 모세혈관 소실 및 경화증을 보일 때를 양성으로 하고 각 절편마다 100개의 사구체를 관찰하여 경화가 있는 사구체수의 백분율 (glomerulosclerosis percentage)을 구하였다. 또한 경화가 있는 사구체에서 병변이 차지하는 범위에 따라 0에서 4+까지 5등급으로 나누어 구분한 후 관찰한 총 사구체 수에 대한 경화율 (sclerosis score)을 계산하였다.

0 : 경화가 없는 사구체

1+ : 경화가 사구체 면적의 1/4 미만

2+ : 경화가 사구체 면적의 1/4~1/2 까지

3+ : 경화가 사구체 면적의 1/2~3/4 까지

4+ : 경화가 사구체 면적의 3/4 이상

경화율 (Sclerosis Score)

=((1+병변을 보이는 사구체수)×1+(2+병변을 보이는 사구체수)×2+(3+병변을 보이는 사구체수)×3+(4+병변을 보이는 사구체수)×4)/총 관찰 사구체수

2) 면역형광 검사: 신장조직은 7.5% 젤라틴과 함께 액체 질소를 이용하여 -70°C로 냉동 고정하였다. 고정된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 아세톤에 5분간 고정한 후 phosphate완충액으로 수세하였다. Fluorescein isothiocyanate conjugated goat anti-mouse IgG, IgA, IgM, 및 C<sub>3</sub> (ImmunoResearch, inc, U S A)를 조직 위에 점적하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 완충액에 수세한 다음 글리세린이 함유된 봉입제로 봉입하고 형광현미경하에서 관찰하였다. 대조군으로는 45일령의 RFM계 백서를 사용하였다.

3) 전자현미경검사: 신장조직을 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 세절하여 2.5% 글루타르알데하이드용액으로 0~4°C에서 2시간 전고정, 0.1 M phosphate완충액으로 세척한 후 1% OsO<sub>4</sub>용액에 2시간 후고정을 실시하여 통상적인 방법으로 탈수 및 포매하여 초박절후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과

전자현미경으로 관찰하였다.

4) TGF- $\beta_2$ 의 면역조직화학 검사: 파라핀에 포매된 조직절편을 Probe-on-Plus (Fisher Biotech® U S A) 유리 슬라이드에 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 붙인 후 모세관 원리를 이용한 Microprobe system (Fisher Scientific Co. U S A)으로 염색하였다.

Xylene과 HistoClear를 1:3으로 섞은 탈랍용액에 적시고 80°C의 열을 가하는 과정을 4회 반복하여 탈랍과정을 거친 후 100% 알콜과 95% 알콜에서 흡수하였다. 내재성 과산화효소를 억제하기 위해 과산화수소수에 반응시킨 후 조직항원이 잘 노출되게 펩신용액으로 전처치를 하고 1X immuno/DNA완충액으로 수세하였다.

TGF- $\beta_2$  항체로는 rabbit anti-TGF- $\beta_2$  다클론항체 (cat#SC-90, Santa Cruz Biotechnology, Inc. U. S. A.)를 항체희석액 (Dako)에 1:50 배율로 희석하여 사용하였다. 항체반응시간은 40°C에서 20분간하였으며 biotin이 부착된 이차항체를 사용한 후 streptavidin HRP 검출계 (Reaseach Genetics, U. S. A.)로 표식하고 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 발색하였다. Harris 헤마톡실린으로 약 10초간 대조염색하여 글리세린이 함유된 봉입제로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

개개의 신사구체에서 TGF- $\beta_2$ 의 발색된 정도는 무작위로 20개의 사구체를 선정하여 발색된 세포의 수와 발색된 정도에 따라 아래와 같이 0에서 3+까지 4등급으로 구분하고 관찰한 총사구체수에 대한 염색지수 (staining score)을 구하였다.<sup>25</sup>

0 : 모든 사구체세포와 메산지움에 음성일 때  
 1+ : 1개 또는 2개의 세포에서 약하게 염색되거나 메산지움의 25% 이하에서 염색될 때  
 2+ : 1개 또는 2개의 세포에서 강하게 염색되거나 3개 이상의 세포에서 약하게 염색되거나 메산지움의 25~50%에서 염색될 때  
 3+ : 3개 이상의 세포에서 강하게 염색되거나 메산지움의 50% 이상에서 염색될 때  
 염색지수 (staining score)  
 $= ((1+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 1 + (2+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 2 + (3+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 3) / \text{총 관찰 사구체수}$

5) TGF- $\beta$  mRNA의 동소보합결합 검사 (In situ hybridization): 파라핀에 포매된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 Probe-on-Plus 슬라이드에 붙인 후 모세관 원리를 이용한 Microprobe system (Fisher Scientific Co)으로 염색하였다. 탈랍용액에서 탈랍한 후 100% 알콜과 95% 알콜에서 흡수후 내재성 과산화효소를 제거하기 위해 acid alcohol에 1분간 반응시킨 후 펩신용액으로 1분간 전처치를 하고 핵산 노출이 용이하게 Prehybe plus (Reaseach Genetics, U. S. A.)에 3분간 처치하였다.

TGF- $\beta$  oligonucleotide 소식자 (probe) (Genemed Biotechnologies, Inc. U S A)는 20 base pair로 5'--GAC/AAG/TTC/AAG/CAG/AGT/AC-- 3'의 염기순서를 가지며

5'에 다수의 biotin입자가 함유되어있다. 희석액은 formamide가 함유되어 있지않은 Brigati 소식자희석액 (Research Genetics, U. S. A.)을 사용하였고 1  $\mu$ g/1  $\mu$ l 농도로 희석하여 사용하였다. 소식자의 보합반응 (hybridization)은 100°C에서 5분간 변성 (denaturation) 시킨 후 65°C와 45°C에서 각각 20분과 60분씩 부란 (incubation) 하였다.

보합후에 비특이적 결합을 한 소식자를 제거하기 위하여 2X SCC로 4회 세척하였다. 표식과정은 Streptavidin HRP 검출계 (Reaseach Genetics, U S A)를 이용하였으며 발색은 AEC를 사용하였다. 대조염색은 Harris 헤마톡실린으로 10초간 하였다.

TGF- $\beta$  oligonucleotide 소식자는 핵에 존재하는 TGF- $\beta$  DNA와 세포질내의 mRNA에 보합반응을 일으키므로 염색후 각각의 절편에서 무작위로 20개의 사구체를 선정하여 사구체세포 중 세포질에서 발색된 세포를 양성으로 하여 양성 사구체세포의 수를 아래와 같은 기준으로 등급을 매기고 관찰한 총사구체수에 대한 mRNA의 발현지수(expression score)를 계산하였다.

0 : 사구체 내에서 발색한 세포가 없을 때  
 1+ : 1~2개의 세포에서 발색하였을 때  
 2+ : 3개 이상의 세포가 뭉쳐져 발색할 때  
 3+ : 많은 세포가 강하게 발색하거나 사구체에 전체적으로 발색할 때  
 발현지수 (expression score)  
 $= ((1+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 1 + (2+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 2 + (3+ \text{병변을 보이는 사구체수}) \times 3) / \text{총 관찰 사구체수}$

## 5. 통계적 방법

이상의 실험 결과는 Wilcoxon-rank sum test를 사용하여 통계적으로 검증하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

## 성 적

### 1. 체중 변화 및 뇨단백

약 3개월까지는 체중이 증가하다 그 이후로는 체중의 변화가 거의 없었다. 뇨단백은 대부분의 예에서 1개월 전후에 나타나기 시작하여 약 2개월 정도에서는 심한 단백뇨를 보였으며 그 이후로는 대부분의 예에서 지속적인 단백뇨를 보였다 (Table 1).

### 2. 광학현미경적 소견

월령이 증가할수록 경화가 나타나는 사구체수는 증가하였고 병변은 사구체모세혈관이 찌그러지고 메산지움이 확장되고 여기에 PAS에 붉게 염색되는 초자양 물질이 침착되고 메산지움에 지방공포가 나타나기도 하며 심한 경우는 보우만 낭과의 유착도 관찰되었다 (Fig. 1).

1개월령의 개체에서는 몇 개의 사구체만이 부분적인

**Table 1.** Changes of mean body weight and mean proteinuria according to age

Age (month)	Mean Body Weight (gm)	Proteinuria (%)			
		0	+1	+2	+3
1 (n=18)	18.96 ± 1.78	36.7	40	22.3	0
3 (n=12)	26.57 ± 2.48	0	20.8	29.2	50
6 (n=6)	29.76 ± 5.33	0	33.3	37.5	29.2

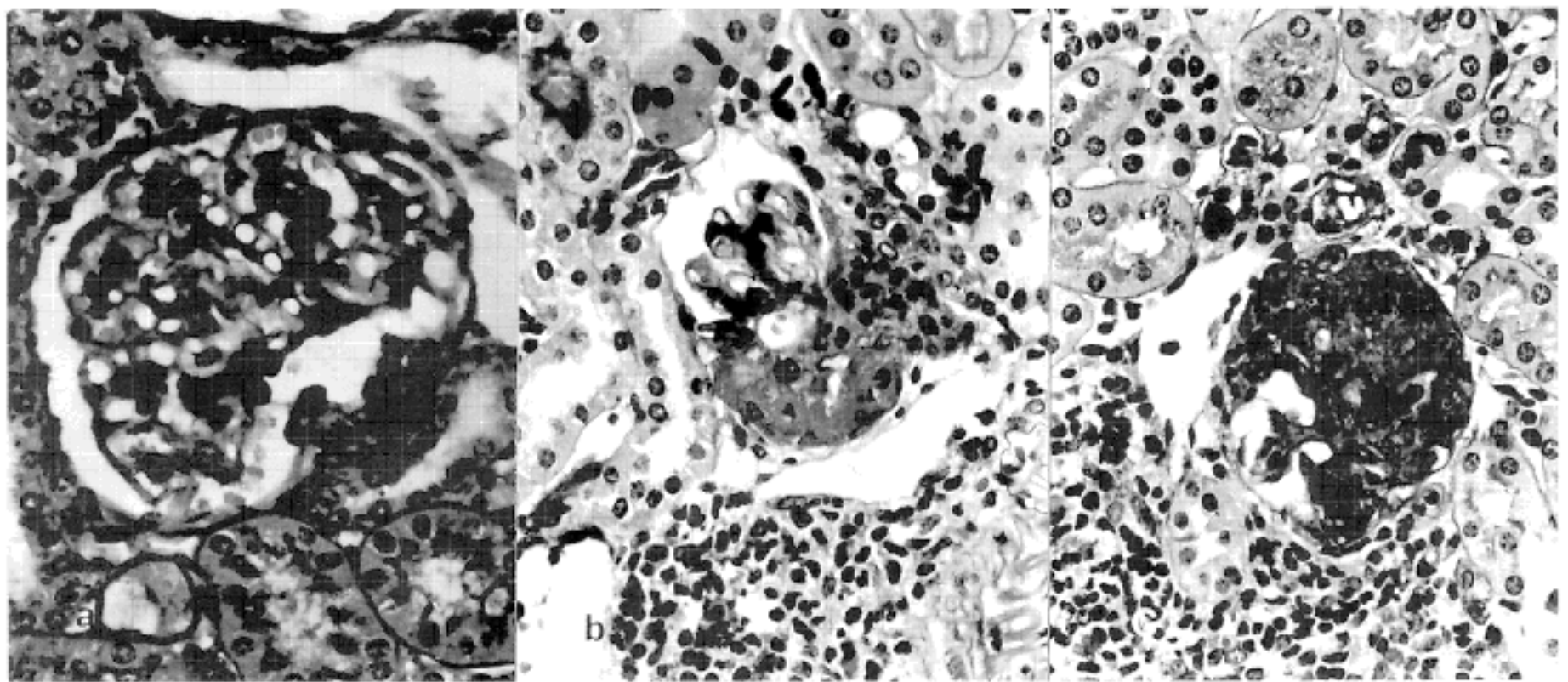
Values; means ± SD.

경화를 보이거나 월령이 증가할수록 그 침범된 수가 증가하여 1개월에서는 3.25 ± 2.05%, 3개월에서는 38.00 ± 7.81% 그리고 6개월에는 48.67 ± 5.47%에서 경화를 보였다 (Table 2). 또한 앞서 정의한 바와 같이 경화율 (sclerosis score)을 계산하였을 때 1개월에서는 0.04 ± 0.04, 3개월에서는 0.77 ± 0.18, 6개월에서는 1.20 ± 0.20으로 각 군간에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 (P < 0.05) (Table 2).

한편 경화가 심한 개체에서는 신 세뇨관과 간질의 변화가 관찰되었는데 신 세뇨관이 위축 또는 확장되고 간질 내에 대식세포와 임파구로 구성된 단핵구성 염증세포들의 침윤을 관찰할 수 있었다.

### 3. 면역형광 검사소견

3개월령의 군에서 시행한 IgG, IgA, IgM, 및 C<sub>3</sub>의 면



**Fig. 1a.** Nonsclerotic glomerulus. 1 month  
**b.** About 50% of total glomerular area is sclerotic (grade 2+). 3 months  
**c.** Totally sclerotic glomerulus. 6 months.

**Table 2.** Sclerosis percentage, sclerosis score, TGF-β<sub>2</sub> immunohistochemical staining score and TGF-β mRNA in situ hybridization expression score of three groups

Group	Focal segmental glomerulosclerosis		TGF-β <sub>2</sub> IHC staining score	TGF-β mRNA ISH expression score
	%	score		
A (n=6)	3.25 ± 2.05*	0.04 ± 0.04*	0.46 ± 0.05*	0.23 ± 0.05*
B (n=6)	38.00 ± 7.81	0.77 ± 0.18*	1.50 ± 0.19*	1.24 ± 0.07*
C (n=6)	48.67 ± 5.47	1.20 ± 0.20	2.29 ± 0.22	2.56 ± 0.12

Values; means ± SD. \*p < 0.05



Fig. 2. Immunofluorescent stain for IgA shows dense granular deposits in mesangial areas, 6 months

벽형광경사에서 메산지움에 피립상의 강한 침착물이 관찰되었다 (Fig. 2). 비조균에서 시행한 검사에서는 IgA는 음성이었으며 IgM과 C<sub>3</sub>는 실험 군에 비해 약한 반응을 보였다.

#### 4. 전자현미경 검사소견

경화된 부위는 사구체모세혈관들의 기저막이 위축 및 응축되고 과량의 혈관간기저물질이 축적되어 있었으며, 이 부분의 메산지움세포는 피사를 보였다 (Fig. 3a, b). 광학현미경검사에서 초자양변화 (hyalinosis)를 보이는 부위는 주로 메산지움으로 전자고밀도물질 (electron dense material)과 교원섬유의 침착이 많았으며 가끔 지방공포도 그 속에서 관찰되었다. 사구체 모세혈관 내에서 리소솜과 지방공포를 포함하는 포말세포들이 관찰되었고 혈관내피세포들에서도 지방공포를 보였다. 상측 상피세포의 족돌기는 기저막 전역에 걸쳐서 융합되어 있었다. 경화를 보이지 않는 사구체에서는 상측 상피세포족돌기의 융합과 지방공포 등 상해의 소견은 보이지 않았지만 일부에서는 기저막자체에서 이미 교원섬유의 존재가 인정되었다. 메산지움을 따라서 전자고밀도물질과 교원섬유의 침착은 C군에서 현저하였다.

#### 5. TGF- $\beta_2$ 항체 면역조직화학 검사소견

사구체 모세혈관 벽과 메산지움에서 양성반응을 보였고 월령이 증가하고 사구체 경화정도가 심한 개체일수록 양성반응을 나타내는 사구체의 수와 그강도가 증가하였다 (Fig. 4). 메산지움이 증가하거나 부분적인 경화를 보이는 사구체에서는 모세혈관이 유지된 부분에서 반응이 강하였고 경화를 보이는 부분과 심한 사구체 경화를 보이는 사구체에서는 반응이 없었다. 각 군간의 염색지수 (A;  $0.46 \pm 0.05$ , B;  $1.50 \pm 0.19$ , C;  $2.29 \pm 0.22$ )는 통계학적으로 이주 유의한 차이를 보였다 ( $p < 0.05$ ) (Table 2). 신 피질의 세뇨관의 상피세포에도 약하게 반

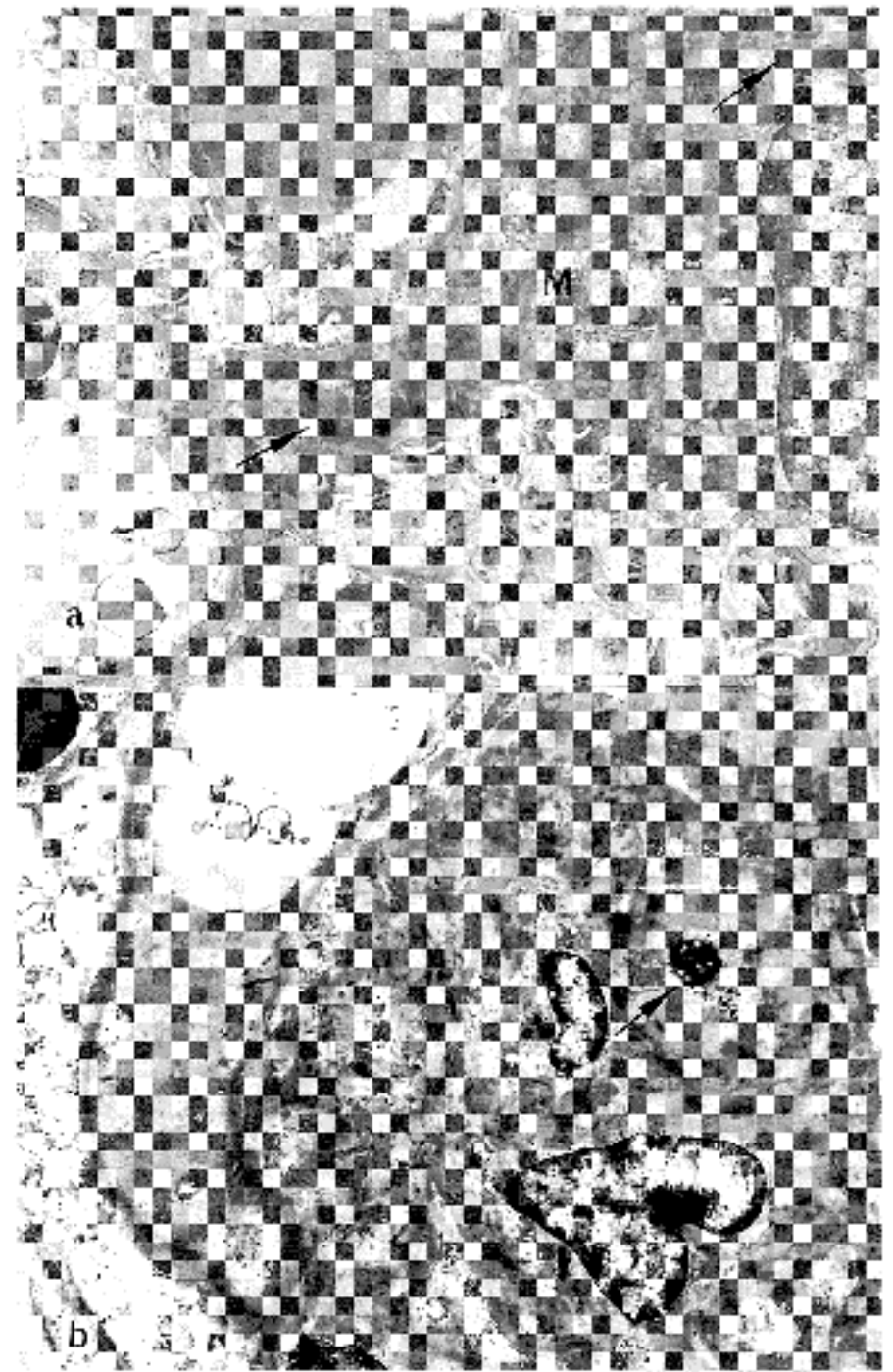


Fig. 3a. Electron microscopically, mesangium (M) is expanded and sclerotic by collagen laydown, in which are scattered electron dense deposits (arrows). Foot processes are still preserved. 1 month (Original magnification  $\times 6,000$ )  
b. Sclerotic portion of glomerulus reveals marked collagen laydown and tiny electron dense deposits. One mesangial cell is dying (arrow). Most foot processes are effaced. 3 months (Original magnification  $\times 4,000$ )

응하였으나 월령에 따른 변화는 없었다.

#### 6. TGF- $\beta$ mRNA 동소보합결합(In situ hybridization)검사소견

TGF- $\beta$  oligonucleotide 소식자는 사구체세포의 핵과 세포질, 세뇨관의 상피세포의 핵, 그리고 간질에 침윤한 염증세포의 핵과 세포질에서 보합반응을 보였다. 사구체에서의 보합은 각군마다 사구체의 경화가 없거나 메산지움이 증식한 사구체에서 반응을 보였는데 사구체의 경화된 부위에서는 보합반응을 관찰할 수 없었다. 정확히 어떤세포인지는 알 수 없었으나 사구체세포의 세포질에서 과립성의 미약하지만 양성의 염색상을 보였고 (Fig. 5) 사구체경화가 적은 군에서는 보합반응을

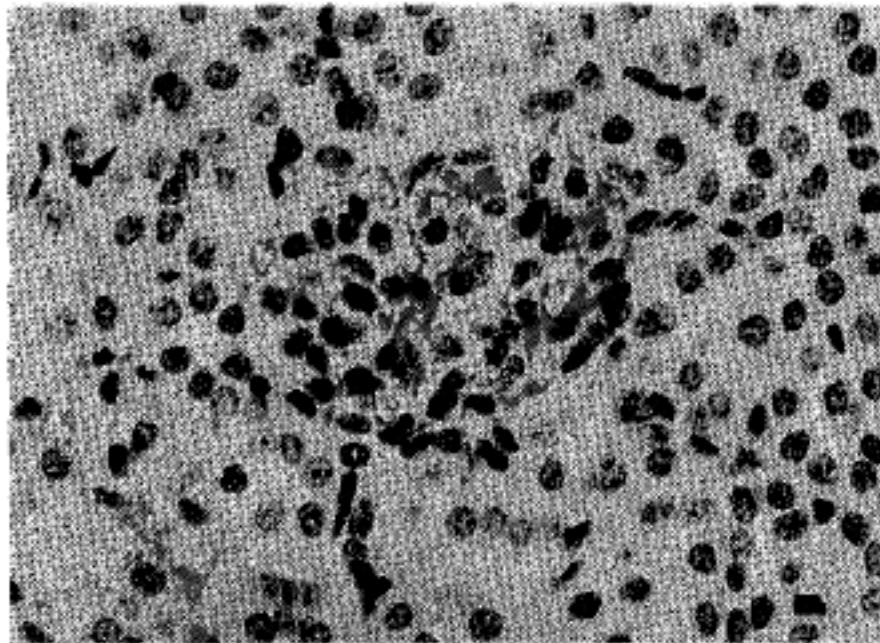


Fig. 4. Immunohistochemical stain for TGF-β<sub>2</sub> antibody shows positive signal in non-sclerotic glomerulus. 6 months

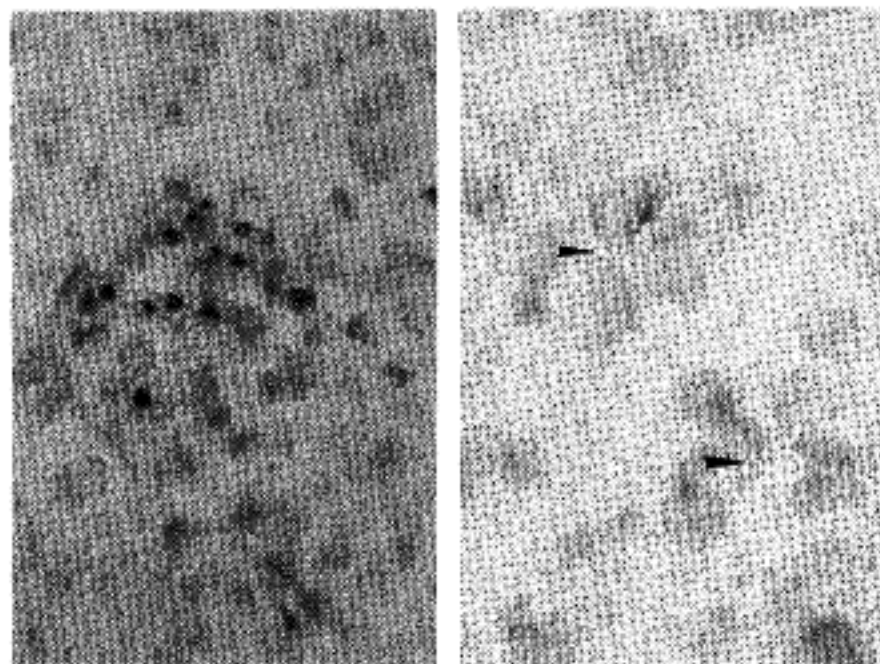


Fig. 5. In situ hybridization for TGF-β mRNA by 20 bp oligonucleotide probe shows nuclear and cytoplasmic expression (arrowheads) in non-sclerotic glomerulus (left: ×400, right: ×1000) 6 months

모인 사구체수가 적었으며 적은 수의 세포에서만 반응을 보인 반면 사구체경화가 심한 군에서는 반응을 보인 사구체수의 반응한 세포의 수도 많았다. 각 군간의 발현지수 (A; 0.23±0.05, B; 1.24±0.07, C; 2.56±0.12)는 통계학적으로 아주 유의한 차이를 보였다 (p<0.05) (Table 2).

### 고 찰

저자들은 사람의 FSGS와 유사한 점진적인 난백뇨의 사구체의 경화를 자발적으로 보이는 FGS/NgaKist 맥서에서 신장의 형태학적인 변화와 사구체경화에서의 TGF-β의 연관성을 알아보기 위하여 본 실험을 시행하였다.

관찰한 결과들을 종합하여 보면 FGS/NgaKist 맥서는 일림이 증가할수록 점진적인 난백뇨와 사구체의 경화를 보여 이 실험모델에서의 사구체경화는 비가역적인 변화로 인간의 신사구체경화와 비슷한 결과를 보였다.

면역형광 검사에서 메산지움에 IgG, IgA, IgM 및 C<sub>3</sub>의 침착을 관찰할 수 있었는데 이는 Yoshida등<sup>22</sup>이 면역전자현미경적 방법으로 관찰한 바와 일치하였다. 이러한 면역글로불린이 침착된 부위는 전자현미경적 검사에서 메산지움을 따라 침착된 전자고밀도물질과 위치적으로 일치하였다. 따라서 이러한 메산지움의 면역글로불린 및 전자고밀도물질의 침착은 이 개체의 사구체 질환이 면역매개성이라는 것을 알 수 있었다. 또한 형태학적으로는 사람의 IgA신병증과 매우 유사하였다.

전자현미경 검사에서 메산지움의 전자고밀도물질의 침착외에 사구체기저막의 위축 및 응축이 있고 과량의 혈관간기저물질의 축적과 시방공포 그리고 족돌기의 융합 등 FSGS에서 보는 전형적인 변화를 보였는데 이러한 기저막의 위축 및 응축 그리고 과량의 혈관간기저물질의 침착은 이 모델에서 과도의 난백뇨의 발생을 설명하는 중요한 소견이며 비정상적인 세포외기질을 시사한다.

TGF-β는 신장의 간질조직에서 섬유화의 조신인자로 처음 밝혀진 이후<sup>12</sup> 현재는 우리 인체의 거의 모든 조직에서 연구되고 있다. 이는 교원질, fibronectin, thrombospondin, tenascin, osteopontin, osteonectin 그리고 proteoglycan 등의 세포외기질의 구성성분의 형성과 방출을 증가시키며 특히 교원질 대사과정 중 교원질 유전인자의 전사과정을 촉진시키고 mRNA의 안정성을 지속시킨다고 알려져 있다.<sup>9,11</sup>

정상 신사구체에서 세포외기질은 제IV형과 제V형의 교원질과 laminin 등으로 구성되어져 있으며 경화를 일으킨 사구체에서는 제I형 및 제III형 교원질, proteoglycan, fibronectin 등이 증가하며 TGF-β의 발현도 증가한다. 이러한 연구의 결과로 TGF-β는 배형성 (embryogenesis)과 조직재생 그리고 섬유화를 일으키는 질환의 주요한 인자로서 인식되고 있다.<sup>9,10</sup>

Ellingsworth등<sup>23</sup>에 의하면 TGF-β는 세포 내외 세포외기질에 존재하며 세포외기질의 단백질과 결합하는데 골 조직 등에서는 heparan sulfate proteoglycan과 decorin 등과 결합한다.

신사구체경화에서의 TGF-β의 발현은 여러 연구자에 의해 알려져 있는데 Kaneto등<sup>27</sup>은 인측 노란을 결찰하여 발생한 맥서의 신장염에서 신 조직의 세포관상피세포에서의 TGF-β mRNA의 증가를 발견하였고, Yamamoto등<sup>28</sup>은 anti-mesangial serum을 주사한 실험모델에서 신 세포관상피 조직, 그리고 간질에 침윤한 단핵염색세포들에서 TGF-β 단백질과 mRNA의 증가를 발견하였다.

반면, Yoshioka등<sup>14</sup>은 IgA 신병증, FSGS, 그리고 만성 사구체신병 등에서 면역전자현미경 검사로 TGF-β 항체의 사구체모세혈관의 기저막과 메산지움에서의 존재를

확인하였고 동소보합결합검사 (in situ hybridization)로 사구체에서의 TGF- $\beta$  mRNA의 발현을 증명하여 TGF- $\beta$ 의 기원을 간질에 침윤한 염증세포가 아닌 사구체자체의 세포임을 증명하였다.

Isaka 등<sup>29</sup>은 in vivo에서 TGF- $\beta$ 와 PDGF 유전자를 transfection시킨 쥐의 신장에서 사구체경화를 유발시켰으며, TGF- $\beta$ 는 사구체세포의 증가보다는 세포외기질의 증가에 더욱 중요한 역할을 한다고 하였으며, Border 등<sup>30</sup>의 연구에 의하면 TGF- $\beta$ 에 의해 증가되는 세포외기질 중 decorin은 TGF- $\beta$ 와 결합하여 그 생화학적 작용을 중화시키고 신사구체 질환의 실험모델에서 decorin을 투여하여 세포외기질의 침착과 증상의 감소를 확인하였다.

본 실험에서는 TGF- $\beta$ 의 oligonucleotide 소식자<sup>31</sup>를 사용하여 TGF- $\beta$  mRNA가 사구체경화증이 심한 실험군의 비경화성의 사구체세포와 간질의 작은 혈관 주위에 침윤한 염증세포에서 발현하고 신세뇨관상피세포에서는 발현하지 않는 것을 관찰하였다. 그리고 TGF- $\beta_2$  항체도 사구체경화를 많이 보이는 실험군에서 높게 나타났다. 따라서 면역복합체의 신사구체에 대한 자극 혹은 상해가 사구체세포의 TGF- $\beta$  유전자를 자극하여 다량의 m-RNA를 형성하고 이로부터 전사되어 형성된 TGF- $\beta$ 가 주위의 세포로부터 교원섬유의 과형성을 유도하여 FGS/NgaKist 백서 신장에서 사구체경화가 일어난다고 생각된다. TGF- $\beta$  형성에 관여하는 세포는 본 실험의 관찰결과로 미루어 볼 때 메산지움세포의 가능성이 높고 위치관계에 따라 내피세포의 가능성도 완전히 배제할 수는 없었다. 그러나 TGF- $\beta$ 의 자극에 의해 교원섬유를 형성한 세포는 어떤 것인지 알 수 없었으나 혈행에 의해 사구체에 모이게 된 탐식세포가 원인세포일 가능성이 높다고 생각되었다.

이상의 결과에서 FGS/NgaKist 백서는 면역성으로 사구체손상을 받은 것으로 인정되며, 메산지움세포의 TGF- $\beta$ 의 증가에 의해서 세포외기질의 침착으로 발생된다고 생각한다. 따라서 이러한 TGF- $\beta$ 의 활성을 억제 내지 제거할 수 있으면 신사구체질환의 치명적인 사구체경화를 억제 또는 방지할 수 있으리라 생각한다.

## 결 론

본 연구는 FGS/NgaKist 백서를 1, 3, 6개월 간격으로 신장을 적출 하여 자연적으로 발생한 사구체경화증을 광학, 면역형광 및 전자현미경적으로 관찰하고 변환 성장인자의 항체 (TGF- $\beta_2$ )와 mRNA를 면역조직화학적 검사와 동소보합결합 검사로서 FGS의 조직학적인 일련의 변화 및 그 병리학적 기전을 알아보았다.

FGS/NgaKist 백서는 월령이 증가할수록 지속적인 단백뇨와 국소적 사구체경화증이 확대되었다. 사구체 모세혈관 벽과 메산지움에 면역복합체가 침착하며 경화증을 보이는 사구체에서는 세포외기질이 증가되었으며

사구체세포의 TGF- $\beta_2$  항체와 mRNA의 발현도 유의하게 증가되었다. 이러한 결과로 보아 FGS/NgaKist 백서에서 발생하는 점진적인 사구체경화의 원인의 일환으로서 TGF- $\beta$ 의 증가에 의한 세포외 기질의 증가를 생각하였으며 침착된 면역복합체들의 신사구체에 대한 자극 혹은 상해가 사구체세포의 TGF- $\beta$  유전자를 활성화하여 다량의 m-RNA를 형성하고 이로부터 전사되어 형성된 TGF- $\beta$ 가 메산지움세포로부터 교원섬유의 과형성을 유도하여 사구체경화가 일어난다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Grishman E, Churg J, Porush JG. Glomerular morphology in nephrotic heroin addicts. *Lab Invest* 1976; 35: 415-24.
2. Markenson AL, Chandra M, Lewy JE, Miller DR. Sickle cell anemia, the nephrotic syndrome and hypoplastic crisis in a sibship. *Am J Med* 1978; 64: 719-23.
3. Bhatena DB, Weiss JH, Holland HN, et al. Focal and segmental glomerular sclerosis in reflux nephropathy. *Am J Med* 1980; 68: 886-92.
4. Cotran RS. Glomerulosclerosis in reflux nephropathy. *Kidney Int* 1982; 21: 528-34.
5. Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 1990; 38: 384-94.
6. Bolton WK, Sturgill BC. Spontaneous glomerular sclerosis in aging Sprague-Dawley rats: II. Ultrastructural studies. *Am J Pathol* 1979; 98: 339-56.
7. Shimamura T, Morrison AB. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol* 1974; 79: 955-1001.
8. Shea SM, Raskova J, Morrison AB. A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotal nephrectomized rat. *Am J Pathol* 1978; 90: 201-10.
9. Roberts AB, McCune BK, Sporn MS. TGF- $\beta$ : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 1992; 41: 557-9.
10. Border WA, Brees D, Noble NA. Transforming growth factor-beta and extracellular matrix deposition in the kidney. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 105-13.
11. 조남훈, 박찬일. 급성 간 손상후 Transforming growth factor- $\beta$ 와 혈청III형 교원질 및 간 재생능의 상관관계와 Prostaglandin E2가 이에 미치는 영향. *대한병리학회지* 1996; 30: 367-87.
12. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factor potentiated by epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5339-43.
13. Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI. Immunohistochemical localization of TGF $\beta$  1, TGF $\beta$  2, and TGF $\beta$  3 in the mouse embryo: Expression patterns

- suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 1991; 115: 1091-105.
14. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, et al. Transforming growth factor- $\beta$  protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 1993; 68: 154-63.
  15. Grond J, Weening JJ, Elema JD. Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest* 1984; 51: 227-35.
  16. Glasser RJ, Velosa JA, Michael AF. Experimental model of focal sclerosis: I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1977; 36: 519-26.
  17. 김미경, 이현순. Puromycin aminonucleoside 장기투여에 의한 진행성 신사구체 경화증에 관한 실험적 연구. *대한병리학회지* 1993; 27: 1-10.
  18. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effects of methylprednisolone on glomerular and medullary mRNA levels for extracellular matrices in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1991; 40: 874-81.
  19. Bertani T, Cutillo F, Zoja C, Broggin M, Remuzzi G. Tubulointerstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 1986; 30: 488-96.
  20. Olson JL, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM, Venkatachalam MA. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int* 1982; 22: 112-26.
  21. Grond J, Schilthuis MS, Koudstaal J, Elema JD. Mesangial Function and glomerular sclerosis in rats after unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 1982; 22: 338-43.
  22. Hyun BH, Wakasugi N, Nose M, Saito T, Tomita T. A new mouse strain manifesting high proteinuria and kidney glomerular defect. *Lab Anim Sci* 1991; 41: 442-6.
  23. Yoshida F, Matsuo S, Fujishima H, Kim HK, Tomita T. Renal lesions of the FGS strain of mice: A spontaneous animal model of progressive glomerulosclerosis. *Nephron* 1994; 66: 317-25.
  24. Lee CH, Kim YJ, Hyun BH et al. Pathological observation of FGS/NgaKist mice with glomerulosclerosis. *Kor J Lab Anim Sci* 1996; 12: 51-9.
  25. Yoshimura A, Gordon K, Alpers CE, et al. Demonstration of PDGF  $\beta$ -chain mRNA in glomeruli in mesangial proliferative nephritis by in situ hybridization. *Kidney Int* 1991; 40: 470-6.
  26. Ellingsworth LR, Brennan JE, For K, et al. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and TGF- $\beta$ . *J Biol Chem* 1986; 261: 12362-7.
  27. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF- $\beta$  1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 1993; 44: 313-21.
  28. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- $\beta$  1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45: 916-27.
  29. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai Y. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993; 92: 2597-601.
  30. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361-4.
  31. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor- $\beta$  complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701-5.
  32. Ray PE, McCune BK, Gomez RA, Horikoshi S, Kopp JB, Klotman PE. Renal vascular induction of TGF- $\beta$  2 and renin by potassium depletion. *Kidney Int* 1993; 44: 1006-13.