

## Gentamicin에 대한 흰쥐 신세뇨관 상피의 변화

경북대학교 의과대학 병리학교실 및 <sup>1</sup>법의학교실

이 병 욱 · 손 태 중 · 채 종 민<sup>1</sup>

### Ultrastructural Feature of Proximal Convoluted Tubular Cells of Rat Induced by Gentamicin

Byoung Yuk Lee, Tae Jung Shon, and Jong Min Chae<sup>1</sup>

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Forensic Medicine, Kyungpook National University, School of Medicine, Taegu 700-422, Korea

Myeloid body formation is an ultrastructural feature of gentamicin induced nephrotoxicity in human being and experimental animals. The origin of the myeloid body is not satisfactorily understood and morphological verification of the developing process of this structure is not fully accomplished. We injected 100 mg/kg/12 hour of gentamicin in 20 Spraque-Dawley rats and examined the ultrastructural feature of the proximal convoluted tubular cells of the kidney every 30 minutes in the first 4 hours, and in 5 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours and 48 hours after injection of gentamicin, with a TEM and a SEM. Myeloid bodies were noted as concentric layers of membranous structures of degenerated endoplasmic reticulum and mitochondria in the lysosome. The number and size of the myeloid body containing lysosomes were increased with time. We can deduce from this observation that injured cell organelles by diffusible gentamicin within the cells are autophagocytosed by lysosomes which were also injured by the drug from pinocytotic vesicles, and incompletely digested organellar remnants are retained in the lysosomes as myeloid bodies. So we think that the myeloid body formation is a result of an exaggerated and a pathologic autophagocytic process due to cell injury induced by gentamicin. (**Korean J Pathol 1998; 32: 43~50**)

**Key Words:** Gentamicin, Nephrotoxicity, Myeloid body, SEM, TEM

### 서 론

Aminoglycoside계 항생제는 임상에 이용될 1969년 당시부터 사람과 동물에 신독성이 있는 것으로 알려졌다<sup>1</sup> 그람음성균에 대한 강력한 항균 효과로 인하여 중증 감염 환자에 아직도 광범위하게 사용되고 있으며, 신손상을 방지하기 위한 많은 연구와 약동학적 프로그램들에도 불구하고 신독성의 발생률은 줄지 않고 있다. 임상에서 사용되는 aminoglycoside들

(gentamicin, tobramycin, amikacin, kanamycin, netilmicin)은 아미노기를 가지는 부쇄 (side chain)와 배당 결합한 육탄당의 양이온성 (cationic) 수용성 항생제로서<sup>2</sup> 신장을 통해서만 체외로 배설이 되며, 신제거율은 이눌린 (inulin)과 비슷하여 재흡수나 분비가 거의 일어나지 않는다. 사구체를 통하여 여과된 일부는 신세뇨관 상행각 세포 내에 들어가게 되며 혈장 농도의 약 20배까지 축적된다.<sup>3</sup> 그 결과 상행각의 신세뇨관 세포는 괴사되어 (급성 세뇨관 괴사, acute tubular necrosis) 특징적으로 비립노성 급성 신부전을 야기한다.<sup>4,5</sup> Aminoglycoside가 세뇨관 세포를 괴사시키는 기전<sup>6-8</sup>은 phospholipase의 억제, 미토콘드리아에서 에너지 생성의 변화, 단백질합성의 억제, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 억제 등으로 설명하고 있으나 확실한 것

접 수: 1997년 8월 9일, 게재승인: 1997년 10월 2일  
주 소: 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50, 우편번호 700-422  
경북대학교병원 해부병리과, 이병욱  
ISSN : 0379-1149

은 아직 밝혀져 있지 않다. Aminoglycoside를 투여 받은 사람과 동물의 신세뇨관 상행직 세포 내에 myeloid body가 많이 생기며<sup>9,10</sup> 세뇨관 세포의 괴사와 동반되었을 경우 이 약제 투여로 인한 신부전증의 진단적인 소견이 된다고 한다.<sup>11</sup> 이러한 myeloid body의 생성과 그 의의에 대해서 많은 생화학적, 투과전자현미경적 및 면역조직화학적 연구가 있어 왔으나 주사전자현미경학적 연구는 많지 않다. 이에 현재 임상적으로 가장 많이 사용되고 있는 aminoglycoside의 하나인 gentamicin을 경시적으로 흰쥐에 투여한 후 광학현미경, 주사전자현미경 및 투과전자현미경을 이용하여 myeloid body의 구조를 관찰하고 이의 생성 과정을 형태학적으로 고찰하여 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

체중 180~230g의 흰쥐 (Sprague-Dawley rat) 21마리를 일정한 기간 사육한 후 건강이 양호한 것을 실험에 사용하였다.

### 2. 방 법

Gentamicin sulfate (100 mg/Kg/12 hour: 이 용량에서 gentamicin은 상피세포의 괴사를 유발하지 않는 수준에서 많은 myeloid body를 생성한다<sup>12,13</sup>)를 복강내에 주사하여 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분, 210분에 각각 두마리씩을, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 후에 각각 한 마리씩을 도살하였다. Ether 마취 하에 개복 및 개흉하여 하행 대동맥을 통하여 녀형용 식염수 (0.5% sodium chloride + 0.4% sodium citrate)를 관류하여 5분간 조직내 혈액을 제거한 후 0.5% glutaraldehyde 와 0.5% paraformaldehyde로 20분간 관류고정을 시행하였다. 관류고정 후 양측 신장을 적출하여 광학현미경과 투과 및 주사전자현미경적 검사를 시행하였다. 정상 대조군으로 생리식염수를 복강내에 투여한 두 마리를 같은 방법으로 도살 후 관찰하였다.

#### 1) 관찰방법:

(1) 광학현미경 검사: 관류고정 후 적출한 오른쪽 신장을 Dubosque Brazil (DB)용액에 2시간 고정하고 하루간 동안 흐르는 물에 수세한 후 Shandon사의 Hypercenter XP로 계열 알코올에 탈수하고 xylene 및 파라핀으로 치환한 후 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 박절기로 2  $\mu$ m 두께로 박절 후 Hematoxyline Eosin (HE) 및 PAS 염색을 시행하였다.

(2) 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscopy, TEM): 관류고정 후 적출한 왼쪽 신장의 피질부를 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)으로 2시간 고정한 후 1% osmium tetroxide (0.1 M phosphate buffer,

pH 7.4, 4°C)로 2시간 동안 후고정하였다. 계열 에탄올에 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 Luft방법에 따라 Epon에 포매하였다. 포매된 조직은 1  $\mu$ m 두께로 박절하여 광학현미경에서 관찰한 후 Porter-Blum MT-2B ultramicrotome으로 Dupont diamond knife를 사용하여 두께 4~6 nm로 초박절하고 Reynolds 방법에 따라 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후 Hitachi H 7000 전자현미경으로 관찰하였다.

(3) 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscopy, SEM): 관류고정 후 적출한 왼쪽 신장의 피질부를 1  $\times$  1  $\times$  4 mm<sup>3</sup>의 크기로 세절한 다음 0.1 M phosphate buffer로 하룻밤동안 6회 수세하였다. 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>)로 2시간 동안 후고정하고 인산 완충액으로 2시간 동안 6회 수세하였다. 25% DiMethyl Sulfoxide (DMSO)로 30분 처리한 후 50% DMSO에 15분간씩 2회 담귀 하였다. 번도닐로 액체질소 동결 탈탄하고 50% DMSO를 다시 가하였다. 인산 완충액으로 1시간 동안 6회 수세하고 1% OsO<sub>4</sub>로 다시 고정한 후 0.1% OsO<sub>4</sub>에 5일간 20°C에 방치하였다 (maceration). Maceration된 시료를 인산 완충액으로 1시간 동안 6회 수세하고 다시 1% OsO<sub>4</sub>에 1시간 반응시킨 후 인산 완충액으로 한시간 동안 6회 수세하였다. 50~99%까지의 계열 에탄올에 탈수한 후 iso amyl acetate로 20분 동안 2회 처리하고 임계점 건조를 시행하였다. 시료를 시료대에 부착시킨후 Pt-Pb를 약 6 nm의 두께로 시료에 피복 하였다. Hitachi S-800 냉전계 방사형 주사전자현미경으로 25 kv의 가속전압에서 관찰하였다.

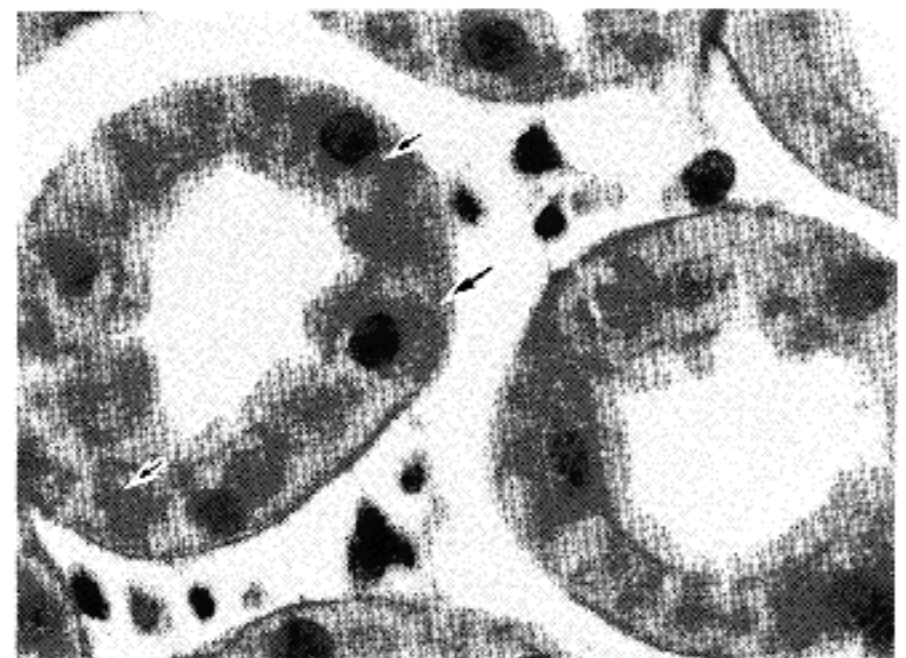


Fig. 1. Proximal convoluted tubule, 48 hours after intraperitoneal injection of gentamicin. The volume of the lysosomes is greatly increased and multiple giant lysosomes (large arrow) and more darkly staining myeloid bodies are visible (small arrow) (PAS).

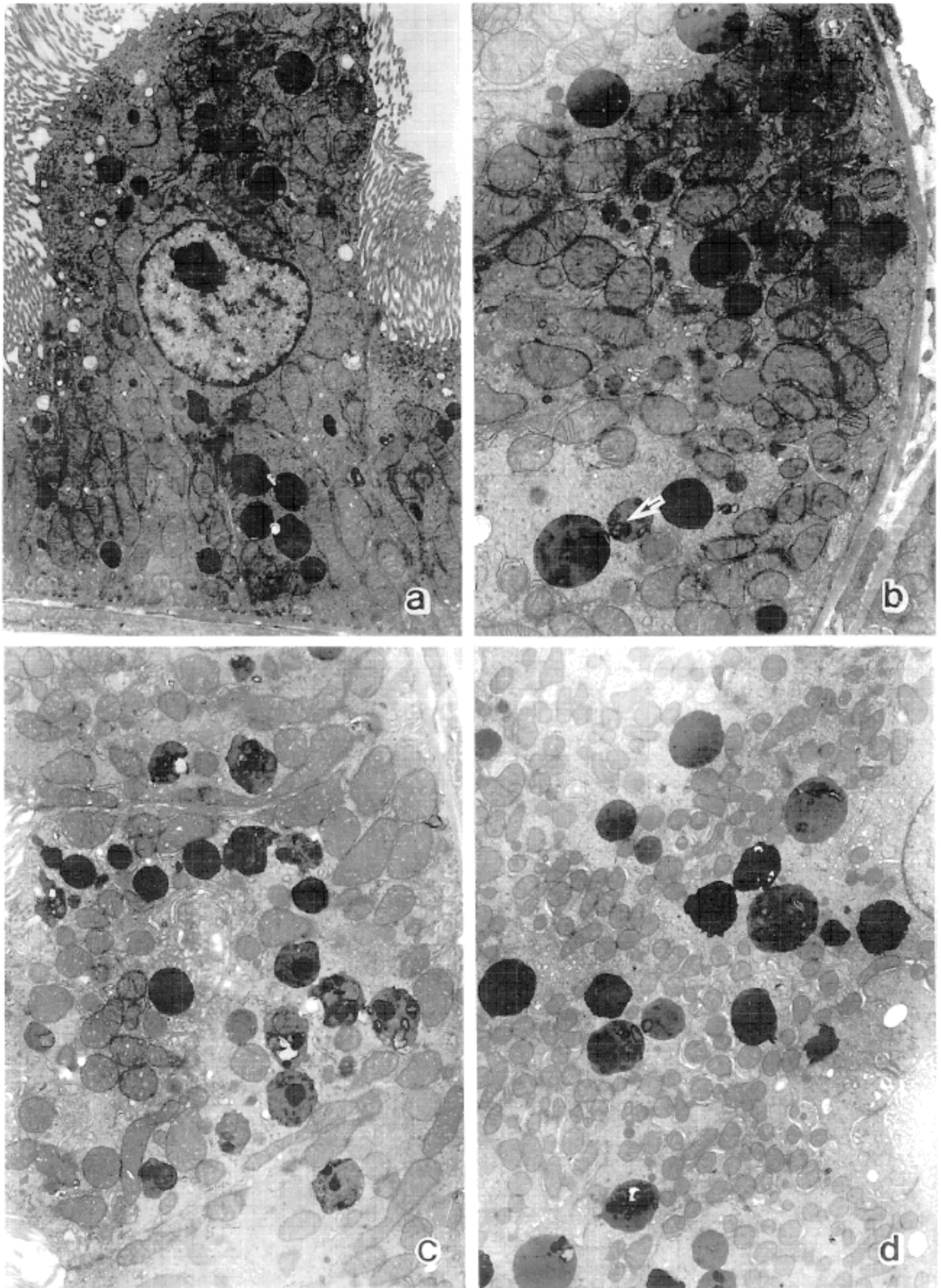


Fig. 2. Proximal convoluted tubular cells: a) control, b) 1 hour, c) 6 hours, d) 48 hours after injection of gentamicin. Myeloid bodies were found from 1 hour after injection (arrow). TEM. (a, d:  $\times 3,500$ , b, c:  $\times 5,000$ ).



## 결 과

### 1. 광학현미경적 소견

통상의 HE 염색상 모든시간대의 검체에서 신세뇨관의 괴사는 관찰되지 않았으며 사구체와 혈관들도 이상이 없었다. PAS 염색 소견은 다음과 같다. 정상 대조군에서는 신세뇨관 상행각세포의 brush border와 세포질의 리소솜 (lysosome)들이 붉은색으로 염색되었다. 1시간 30분 후부터 신세뇨관 상행각 및 하행각 세포내에 리소솜의 양이 증가하기 시작하였으며 3시간 30분에서 리소솜 내에 더욱 짙은 붉은색으로 염색되는 과립 (myeloid body)들이 관찰되었다. Gentamicin 투여 후 48시간에 도살한 쥐의 신장 상행각 세포의 세포질은 리소솜으로 충만해 있었다. 많은 리소솜들은 세포핵의 크기로 커져 있었다 (Fig. 1).

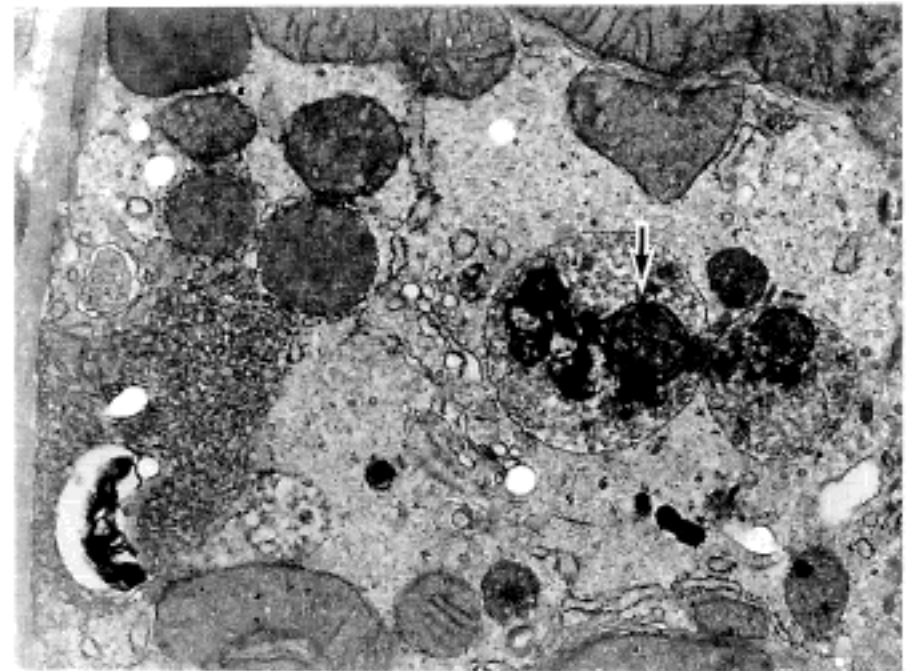


Fig. 5. Myeloid bodies and a mitochondria-like structure (arrow) in lysosomes. TEM. ( $\times 20,230$ ).

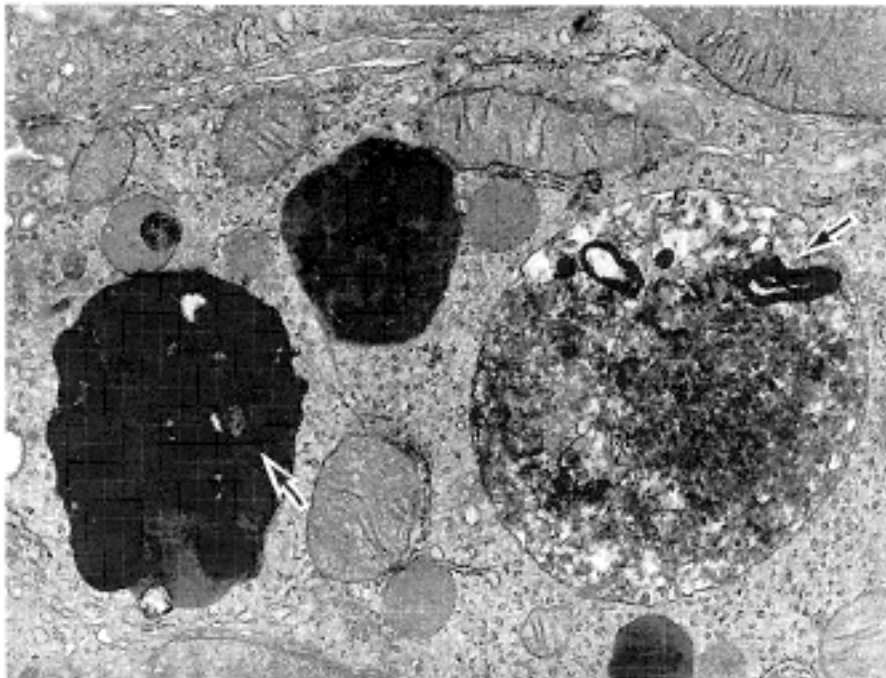


Fig. 3. Myeloid bodies (arrows) in lysosomes. TEM. ( $\times 17,340$ ).

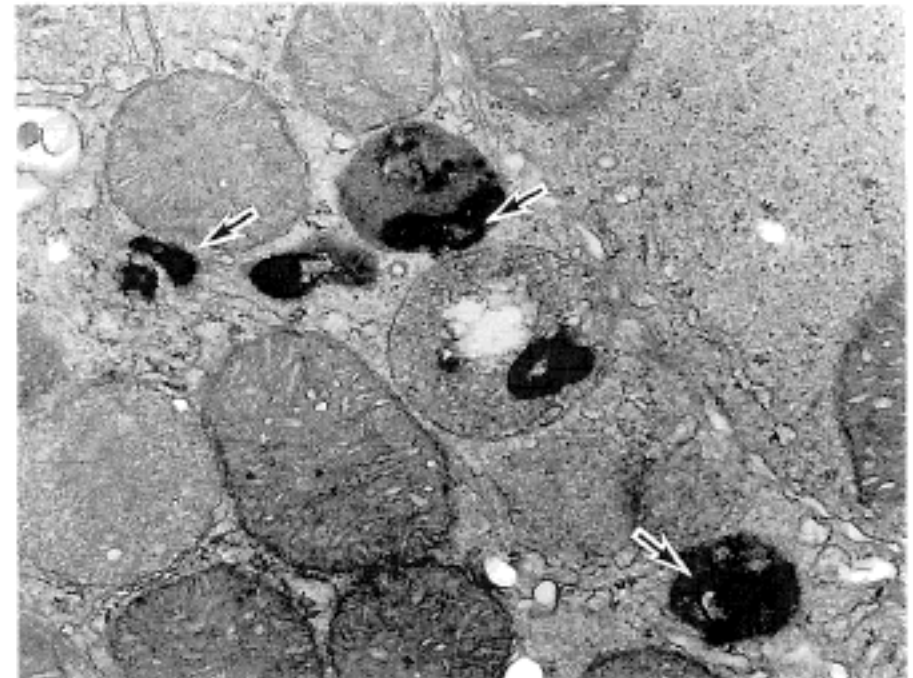


Fig. 6. Myeloid bodies in lysosomes and cytoplasm (arrows). TEM. ( $\times 34,680$ ).

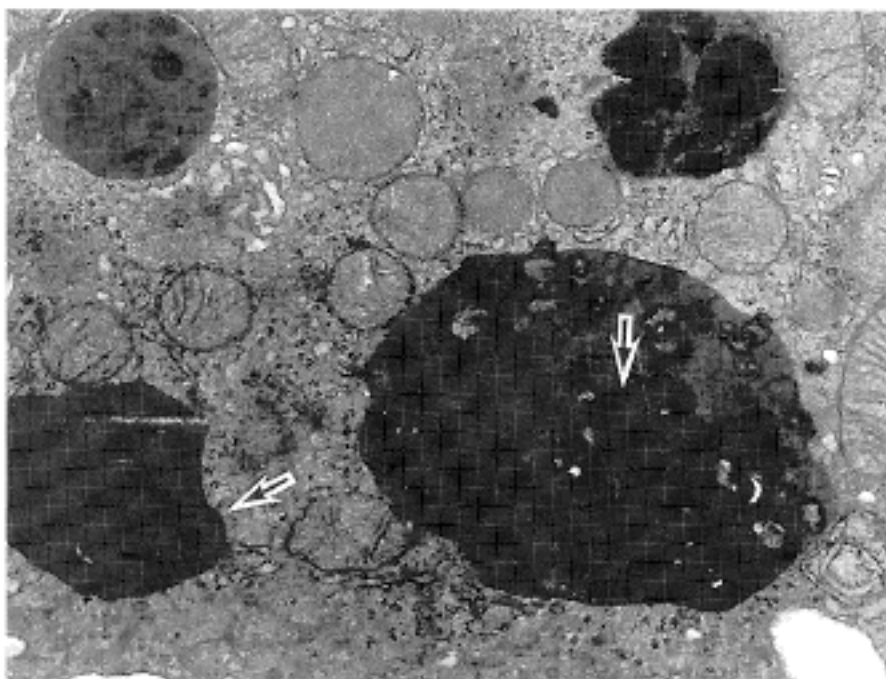


Fig. 4. Myeloid bodies (arrows) in lysosomes. TEM. ( $\times 20,230$ ).

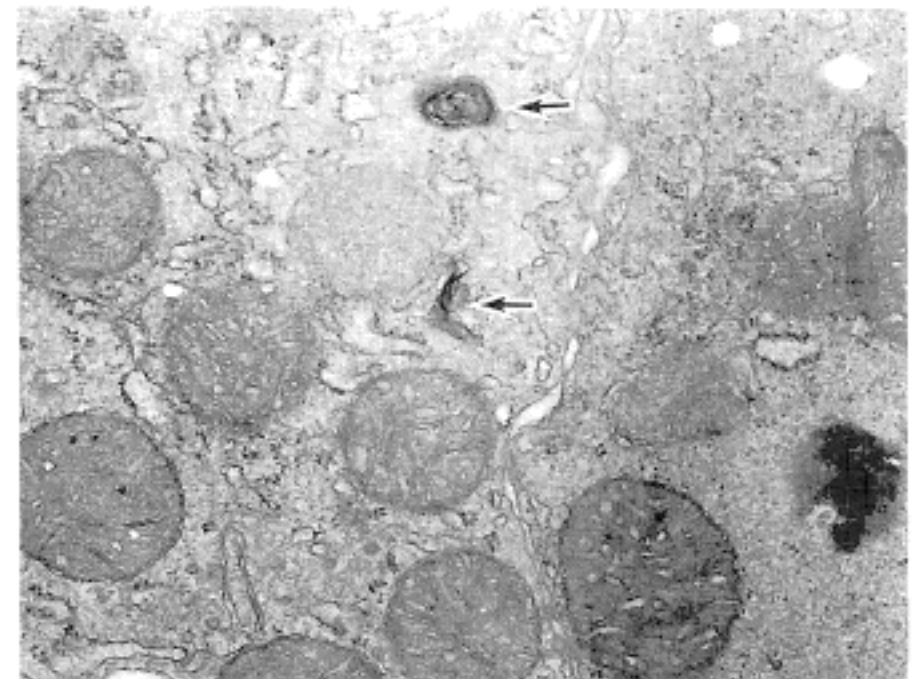


Fig. 7. Myeloid bodies in cytoplasm (arrows). TEM. ( $\times 34,680$ ).



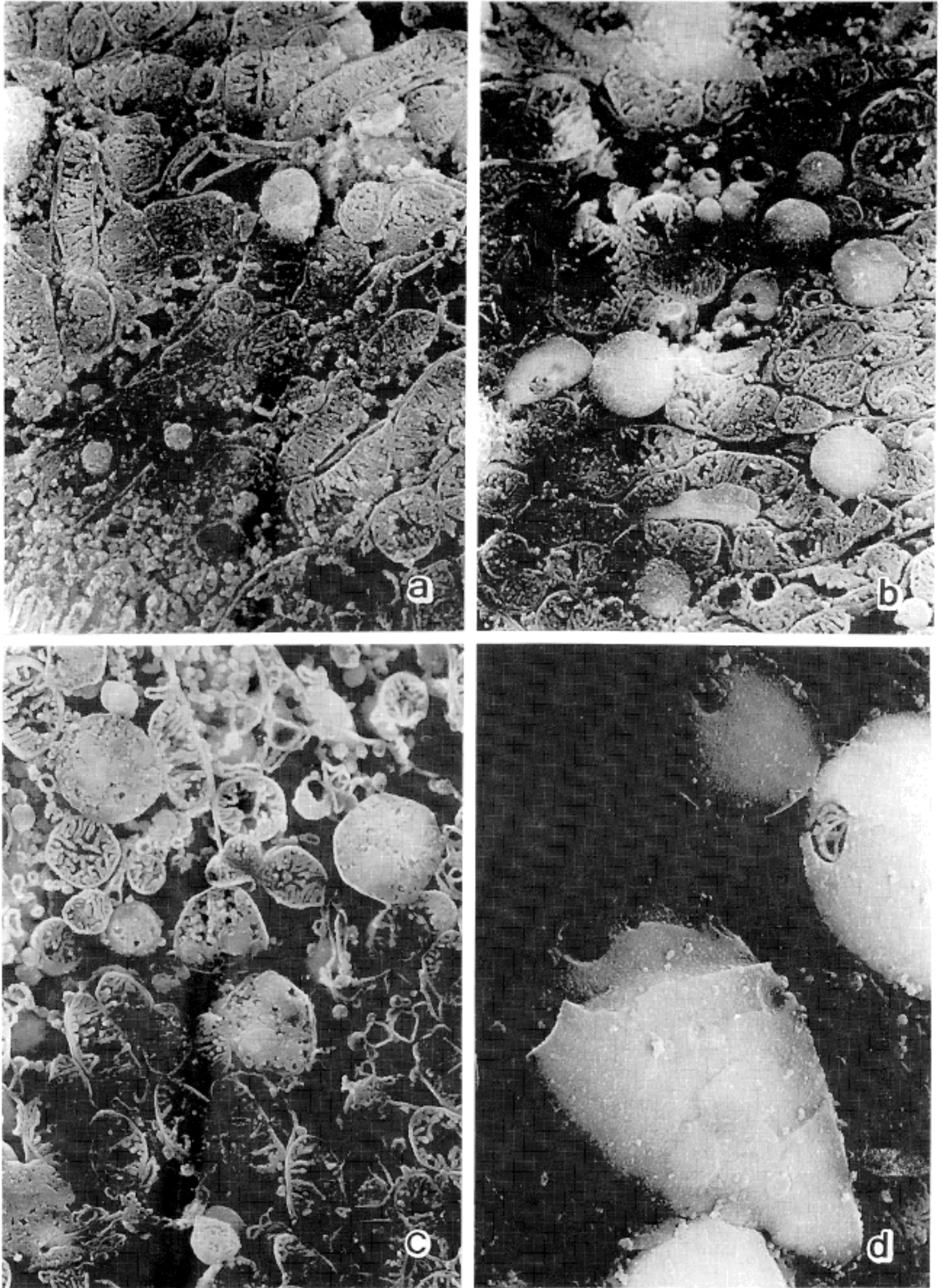


Fig. 8. Proximal convoluted tubular cells: a) control, b) 1 hour, c) 6 hours, d) 48 hours after injection of gentamicin. SEM. ( $\times 10,000$ ).

2. 투과전자현미경학적 소견

정상 대조군의 상행각 상피세포는 내강 쪽으로 많은 미세융모를 가지고 있었고 세포 내에는 밀집된 미토콘드리아, 소포체, 골지체, 그리고 리소솜을 포함하고 있었다 (Fig. 2a). 주사 후 1시간 쯤부터 숫적 증가와 더불어 커진 리소솜 내에서 myeloid body가 관찰되기 시작하였다 (Fig. 2b). 세포 상부의 미세융모는 이상이 없었고 미토콘드리아는 경한 부종을 보였다. 시간이 지나면서 myeloid body를 가지는 리소솜의 수가 많아졌고 리소솜 내의 myeloid body도 더 많이 관찰되었다 (Fig. 2c, 2d). Myeloid body들은 저배율에서 osmium 친화성의 둥근 점으로 보였고, 고배율에서 중층의 원심상의 막구조로 리소솜 내에서 관

찰되었으며 (Fig. 3~6), 세포질내에서도 경계막 없이 가끔 관찰되었다 (Fig. 6, 7). 리소솜내에서 myeloid body와 더불어 세포소기관으로 생각되는 구조도 관찰되었다 (Fig. 5).

3. 주사전자현미경학적 소견

정상 대조군의 상행각 상피세포 상부에 있는 리소솜은 작고 과립상의 기질을 가지고 있었으며 (Fig. 8a) 세포 하부의 것은 좀 더 크고 경화된 기질을 가지고 있었다. Gentamicin 주사 후 30분에는 정상 대조군과 차이가 없었다. 1시간 후 리소솜은 크기가 커지고 그 수도 많아졌으며 (Fig. 8b) 그 속에서 myeloid body들

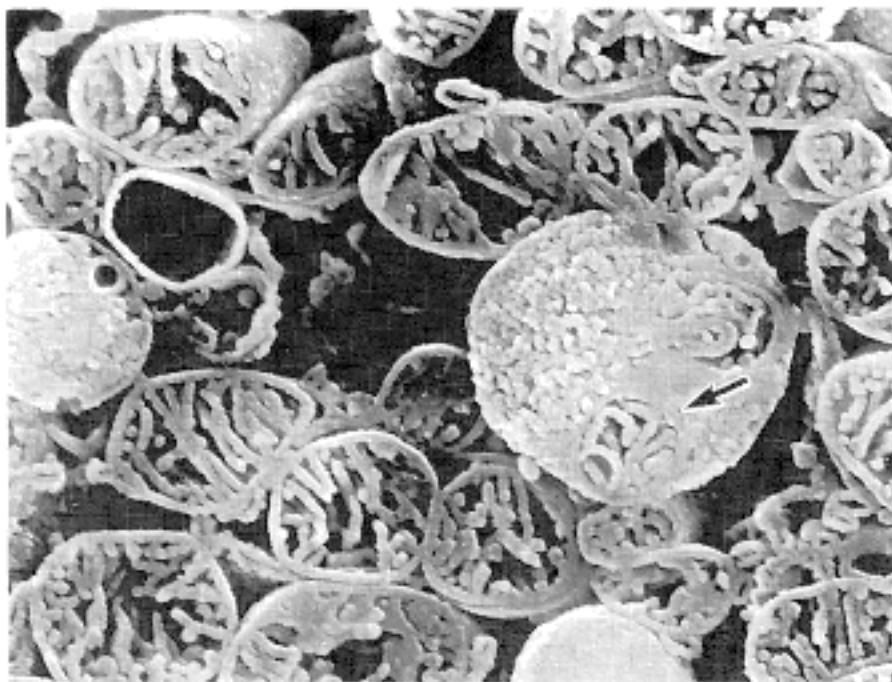


Fig. 9. A lysosome containing a mitochondrion-like structure (arrow). Compare to the surrounding mitochondria. SEM. (×20,000).

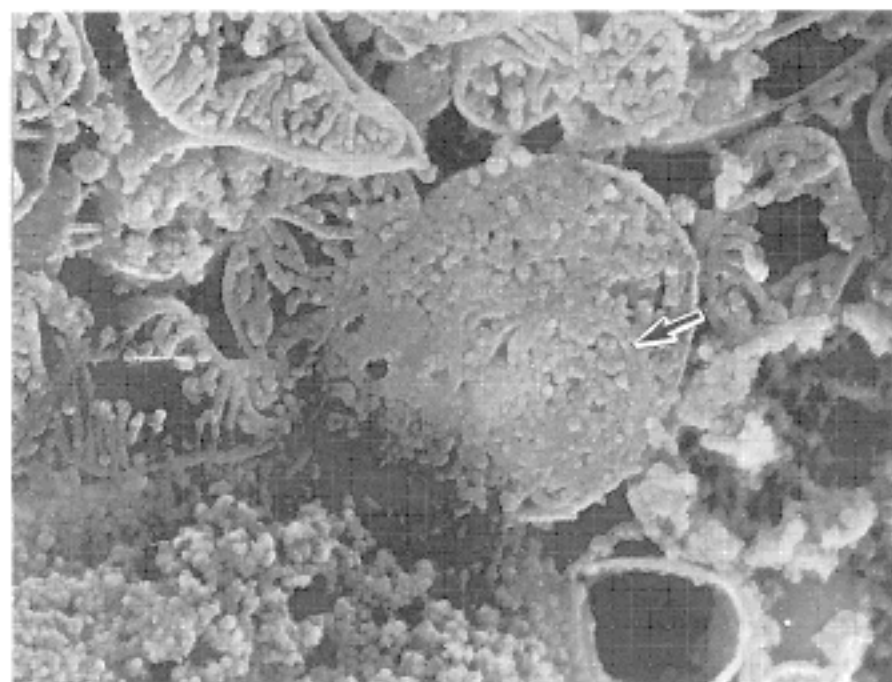


Fig. 10. A lysosome containing the ER-like structure (arrow). Note a vague concentric arrangement. SEM. (×20,000).



Fig. 11. Lysosomes containing mature myeloid bodies. Concentrically arranged membranous structures are evident. SEM. (×20,000).

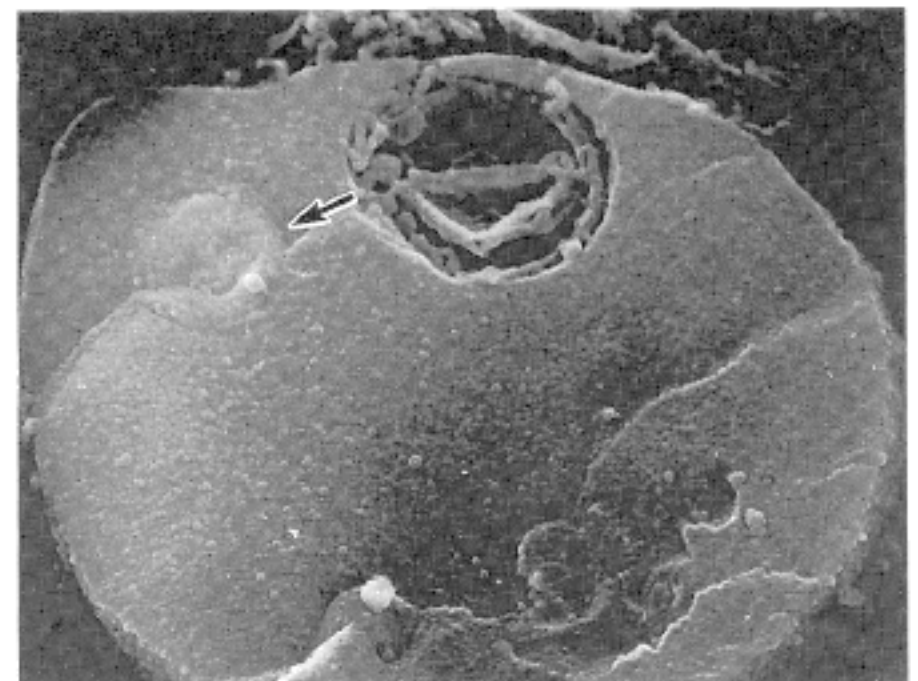


Fig. 12. A proximal convoluted tubular cell. Forty eight hours after i.p injection of gentamicin shows extremely dense stroma and finger-print-like myeloid bodies (arrow). SEM. (×20,000).



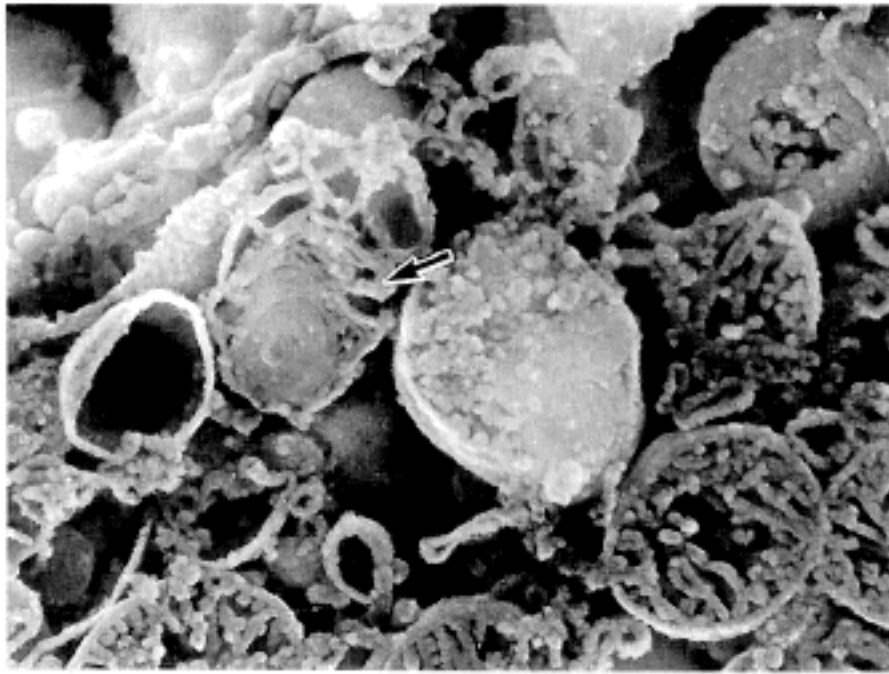


Fig. 13. Several whorled membranous structures (arrow) are also noted in the cytoplasm outside the lysosome. SEM. ( $\times 20,000$ ).

이 관찰되기 시작하였다. 시간이 지나면서 myeloid body를 포함하는 리소솜은 많아졌고 (Fig. 8c), 48시간 째에 채취한 검체에서는 세포질의 반이상을 이룬 구조물들이 차지하였으며 세포핵의 크기와 비슷한 거대 리소솜들이 출현하였다 (Fig. 8d). 각시간대의 검체에서 myeloid body를 가지는 리소솜 외에 소포체와 미토콘드리아의 형태를 가지는 구조물을 포함한 것들이 관찰되었고 동심원상의 구조를 만들려는 모습을 보였다 (Fig. 9, 10). Myeloid body들은 중첩된 동심원상의 막구조를 가지고 있었다 (Fig. 11). 48시간 째의 거대 리소솜은 아주 경화된 기질을 가지고 있었으며 그 속에 myeloid body라고 생각되는 구조물들이 지문 (finger-print)의 형태와 비슷하게 들어 있었다 (Fig. 12). 리소솜 외의 세포기질 내에도 동심원상의 막구조를 가지는 구조물 (myeloid body)들이 소포체와 관련하여 한계막이 없이 가끔씩 각시간대에서 관찰되었다 (Fig. 13).

## 고 찰

Gentamicin은 수용성 항생제로서 신세뇨관 내강으로부터 신세뇨관 상행각 세포의 brush border에 있는 특이 수용체와 결합하여<sup>14</sup> 음세포작용 (pinocytosis)에 의해<sup>13,15</sup> pinocytotic vesicle의 형태로 상행각세포 내로 들어가 리소솜 (primary lysosome)과 결합하여 cytosegresome (secondary lysosome)을 형성한다. 시간이 지나면서 이 cytosegresome 내에 myelin figure를 담은 myeloid body가 출현한다.<sup>16</sup> 이러한 myeloid body가 cytosegresome내에 형성되는 기전은 명확히 설명되지 않고 있다. Autoradiographic study<sup>13</sup>에 의하면, 투여 1시간 후에 gentamicin은 세포 상부의 음세포체 (pinocytotic vesicle) 내에도 증명되지만 세포질내

에 전반적으로 분포하며, 6시간이 지나서는 리소솜 내에 그 농도가 증가되고 48시간이 지나면 리소솜 내에 주로 국한되어 나타난다고 한다. 이는 gentamicin이 투여 후 몇시간까지는 세포질로 확산할 수 있음을 의미한다. 그러므로 이 기간 동안에 gentamicin이 세포내 소기관들에 손상을 줄 수 있을 것이며, 이렇게 본다면 리소솜의 gentamicin 축적은 세포 손상 후의 수복과정에서 생긴 것이라 할 수 있을 것이며, 본 실험의 TEM 및 SEM에서 관찰한 바로 보아 myeloid body의 형성은 병적인 자가탐식 (autophagocytosis)에서 기인한다. 투여된 gentamicin의 용량에 따라 차이가 있겠지만 투여후 약 80분이 지나면 myeloid body를 관찰할 수가 있는데 본 실험에서는 투여 후 1시간째부터 관찰되었다. 이는 실험동물의 차이와 상태에 기인한다고 생각된다. 또한 PAS stain에서 전자현미경보다 myeloid body가 관찰되기 시작한 시간이 늦은 것은 광학현미경의 해상력의 한계 때문이다. 본 실험의 TEM 및 SEM에서 관찰한 다양한 리소솜의 형태는 myeloid body의 형성 과정을 잘 보여 주고 있다. Gentamicin 투여 1시간 이후로 관찰된 바와 같이 동심원상의 구조를 이루려는 소포체 및 미토콘드리아가 리소솜 내에서 증명되고 (Fig. 5, 9, 10) myeloid body를 포함한 리소솜들이 함께 관찰되는 것으로 보아, myeloid body의 기원은 변성된 세포 소기관들 (주로 소포체와 미토콘드리아)임을 시사한다. 즉 세포질로 확산된 일부의 gentamicin이 세포 소기관에 손상을 주고, 손상 받은 소기관들은 자가탐식 공포 (autophagic vacuole)를 형성하여 리소솜 (primary lysosome)과 결합하였으나, gentamicin을 포함한 음세포체와 결합하여 이미 손상을 받은 리소솜 (cytosegresome, secondary lysosome)은 이들 구조들을 잘 분해할 수 없게 되고, 결국 myeloid body라는 구조를 남긴다고 생각할 수 있다. 저자가 관찰한 이러한 일련의 과정을 정상 대조군에서는 찾아 볼 수 없었으므로 이는 gentamicin에 의한 것이며, 결국 gentamicin에 의한 신세뇨관 상행각 세포내 myeloid body의 생성은 병적인 자가탐식의 산물이다. 리소솜 외의 세포기질에서 한계막없이 관찰되었던 myeloid body들 (Fig. 6, 7, 13)은 gentamicin 또는 cytosegresome으로부터 누출된 효소에 의하여 생긴 것으로 알려져 있지만 (lysosomal leakage) 현재로서는 명백한 발생기전을 설명하기 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 면역 주사전자현미경을 이용한 gentamicin의 세포내에서의 이동 경로를 추적하면 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

## 결 론

Myeloid body의 형성기전 및 그 과정은 정확히 알

려져 있지 않으며 이의 주사전자현미경학적인 고찰은 이루어져 있지 않다. 저자들은 20마리의 흰쥐에 100 mg/kg/12 hour의 gentamicin을 복강내에 주사한 후 상행각 신세뇨관 세포의 초미형태학적인 변화의 과정을 살펴보았다. 투과 및 주사전자현미경상 myeloid body는 동심원상의 중층의 지질의 형태로 리소솜 내에 주사 1시간 후부터 나타났다. 주사전자현미경 및 투과전자현미경상 소포체와 미토콘드리아를 가지는 리소솜들이 myeloid body를 가지는 리소솜들과 함께 관찰되어 이들로부터 myeloid body가 형성됨을 알 수 있었다. 결국 aminoglycoside에 의한 신세뇨관 상행각 세포내 myeloid body의 생성은 병적인 autophagocytosis의 산물로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Falco FG, Smith HM, Arcieri GM. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. *J Infect Dis* 1969; 119: 406-9.
2. Smith CR, Baughman KL, Edwards CQ, et al. Controlled comparison of amikacin and gentamicin. *N Engl J Med* 1977; 296: 349-54.
3. De Broe ME, Paulus GJ, Vepooten GA, et al. Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984; 25: 643.
4. Bennett WM, Luft FC, Porter GA. Pathogenesis of renal failure due to aminoglycosides and radiographic contrast media. *Am J Med* 1980; 69: 767-74.
5. Cronin RE. Aminoglycoside nephrotoxicity; pathogenesis and prevention. *Clin Nephrol* 1979; 11: 251-8.
6. Bennett WM. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Nephron* 1983; 35: 73-7.
7. Mela-Riker LM, Widener LL, Houghton DC, et al. Renal mitochondrial integrity during continuous gentamicin treatment. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 979-84.
8. Bennett WM, Mela-Riker LM, Houghton DC, Gilbert DN, Buss WC. Microsomal protein synthesis inhibition; an early manifestation of gentamicin nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988; 255: F265-9.
9. Vera-Roman J, Kristinakantha JP, Cuppag FE. Gentamicin nephrotoxicity in rats. I. Acute biochemical and ultrastructural effects. *Lab Invest* 1975; 33: 412-7.
10. Kosek JC, Mazze RI, Cousins MJ. Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab Invest* 1974; 30: 48-57.
11. Bennett WM, Gilbert DN, Houghton D, Porter GA. Gentamicin nephrotoxicity in man: Morphologic and pharmacologic features. *West J Med* 1977; 126: 65-8.
12. Lennart N, Anders B, Joseph WD. Isolation of myelin bodies from the kidney cortex of gentamicin treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1989; 984: 365-72.
13. Richard PW, Vecihi B, Claffertene C, Eugene M, Harold S. Transport of gentamicin in rat proximal tubule. *Lab Invest* 1983; 48: 212-20.
14. Sastrasinh M, Knaus TC, Winberg JM, et al. Identification of the aminoglycoside binding site of renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222: 350-8.
15. Silverblatt F, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubular cell. *Kidney Int* 1979; 15: 335-45.
16. Vanderville A, Farman N, Morin JP, Fillastre JP. Gentamicin incorporation along the nephron: autoradiographic study of isolated tubules. *Kidney Int* 1981; 19: 529