

Inv 유전자이식 마우스에서 발생한 다낭신의 형태학적 연구

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단병리과

서 연 립 · 김 미 경 · 한 정 호

Morphologic Characterization of Polycystic Kidney in *inv* Transgenic Mouse

Yeon-Lim Suh, Mi-Kyung Kim, and Joung-ho Han

Department of Diagnostic Pathology, Sungkyunkwan University College of Medicine,
Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea

The aim of this study was to characterize the morphology of a polycystic kidney which was found in 100% of the transgenic mice homozygous for *inv* mutation and to gain insight into the pathogenesis of inherited polycystic kidney disease during the pre- and postnatal periods. The fetal and postnatal kidneys from the homozygous and heterozygous transgenic mice were examined by the light, transmission and scanning electron microscopes, image analyzer, and an immunohistochemistry utilizing the antibodies specific for each segment of the renal tubules (*Tetragonolobus purpureas*, *Arachis hypogaea*, Tamm-Horsfall protein, AE1/AE3, EMA, vimentin, *Phaseolus vulgaris*) was performed to determine the site of origin of renal cysts. Two developmental phases of a cystic disease were identified. The first phase, seen in fetal kidneys, was characterized by dilatation mainly of the proximal tubules and a few distal tubules. The later phase, in postnatal period, was characterized by progressive enlargement of the kidneys due to mainly cystic change of the collecting ducts, which distorted the normal architecture of both cortex and medulla and almost completely replaced the renal parenchyma. The cystic dilatation involved all segments of the nephron and the collecting duct as well as the Bowman's spaces of glomeruli. The epithelial cell hyperplasia was found as a micropolyp formation within the renal cysts and an increase in PCNA positive cells. These findings suggest that a cyst is not simply a ballooning of a renal tubule and the stretching of cells, formerly thought to be due to an altered compliance of an abnormal basement membrane, but indeed the result of increased numbers of tubular epithelial cells. (Korean J Pathol 1998; 32: 479~487)

Key Words: Polycystic kidney, Transgenic mouse, Epithelial hyperplasia, Lectin immunohistochemistry, Electron microscopy

서 론

사람에서 발생하는 다낭성 신질환은 유전 및 형태학적으로 이질적인 여러 질환으로 구성되어 있으며 이들 중 유전성 다낭성 신질환은 크게 상염색체우성과 열성

으로 유전되는 두 질환이 대표적이다.¹ 형태학적으로 상염색체우성 다낭성 신질환은 신세뇨관의 원위부를 침범하는데 반하여 상염색체우성 다낭성 신질환은 네프론의 모든 분절을 침범하는 것으로 알려져 있다.²⁻³ 현재까지 다낭성 신질환에 관한 많은 연구가 진행되어 왔으나 정확한 원인과 병인은 알려져 있지 않고 여러 가설들이 주장되고 있다. 즉 신세뇨관의 상피세포의 이상 증식⁴⁻⁵ 신세뇨관 상피세포의 물과 용질의 운반이상,⁶ 기저막의 합성과 대사과정의 이상,⁷⁻⁹ 부분적인 신세뇨관의 폐쇄¹⁰ 등으로 이들 가설은 화학물질에 의해 유발된 다낭성 신질환의 실험모델을 이용하여 얻어진 연구 결과에 기초를 둔 것으로 실제 사람의 것과는 형태학적

접 수: 1998년 2월 6일, 게재승인: 1998년 5월 28일
주 소: 서울 강남구 일원동 50번지, 우편번호 135-710
삼성서울병원 진단병리과, 서연립

ISSN : 0379-1149

*본 연구는 삼성전자 부설 삼성생명과학연구소 연구비 (C95-023)의 보조로 이루어졌음.

으로 다르며 어느 한 가설만으로는 다낭성 신질환이 유발되지 않기 때문에 다낭성 신질환의 병인에 관한 연구에 어려움이 있다. 또한 사람의 다낭성 신질환의 병인에 관한 연구는 임상적으로 질병의 초기 단계에 해당하는 재료를 얻기 어려워 연구를 수행하는데 한계가 있다. 본 연구는 사람의 다낭성 신질환과 형태학적으로 매우 유사한 신장의 낭성변화를 보이는 *inv* 유전자이식 마우스 (transgenic mouse)를 이용하여 다낭신의 태생기 및 출생직후에 걸쳐 발생학적 및 형태학적 관찰을 함으로써 다낭신의 발생과정과 병인을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험군은 *inv* 돌연변이 유전자에 대한 동형접합체 생쥐로 100%에서 양측성 다낭신을 갖고 있으나 출생 후 1~2일 이내에 사망하여 이를 얻기 위해서는 OVE210 유전자이식마우스의 성숙한 이형접합체 암수를 각각 유지 번식시켰고 이들 암컷과 수컷 한쌍씩을 일주일에 1회 오후 3시경 자연교미를 시키고 다음날 아침 질내를 검사하여 플러그가 있으면 임신 제 0.5일로 정하였다. 임신한 암컷을 임신기간 별로 경부탈구 (cervical dislocation)로 도살하고 개복하여 배아 및 태아를 얻었다. 동일한 연령의 이형접합체는 대조군으로 사용하였다. OVE210 유전자이식마우스는 Ty811C tyrosinase minigene을 흰쥐 (inbred albino mouse strain (FVB/N))의 단일세포기의 배아에 미세주사 (microinjection)함으로써 생겨난 것으로 출생시 눈에 색소가 침착되며 성숙한 이형접합체 생쥐는 갈색 털을 가지고 있어, 흰색 털을 가지고 있으며 눈에 색소침착이 없는 비유전자이식마우스 (non-transgenic mouse)와 외형적으로 구분이 가능하다.¹¹ OVE210 유전자이식마우스는 꼬리에서 추출한 DNA를 이용한 Southern hybridization에 의해 이식된 유전자 (transgene)가 통합된 곳 (integration site)의 유무로 확인할 수 있다. 실험에 사용한 동물의 수는 임신 10.5일부터 15.5일까지는 1마리씩, 임신 16.5일에서 18.5일까지는 4마리씩으로 출생전 배아는 총 18마리였고 대조군은 연령별로 실험군과 동일한 수를 이용하였다. 출생후 1일된 생쥐는 실험군과 대조군 각각 4마리를 이용하였으며 생후 3일 (2마리), 5일 (1마리), 7일 (1마리)된 실험군은 OVE210 유전자이식마우스와 ICR생쥐를 교배하여 만든 교잡생쥐를 실험군으로 이용하였다. 정상 신조직과 비교 관찰을 위하여 대조군은 연령별로 실험군과 동일한 수의 이형접합생쥐를 사용하였다.

2. Southern hybridization

배아 및 태아 생쥐의 꼬리에서 페놀-에탄올법을 이용하여 추출한 genomic DNA 10 µg을 Eco RI 효소로 분해 처리하였고 0.8% agarose gel에서 전기영동을 한 후 나일론 막에 전사하였다. 2.0 kb Hind III fragment (p3.2H)

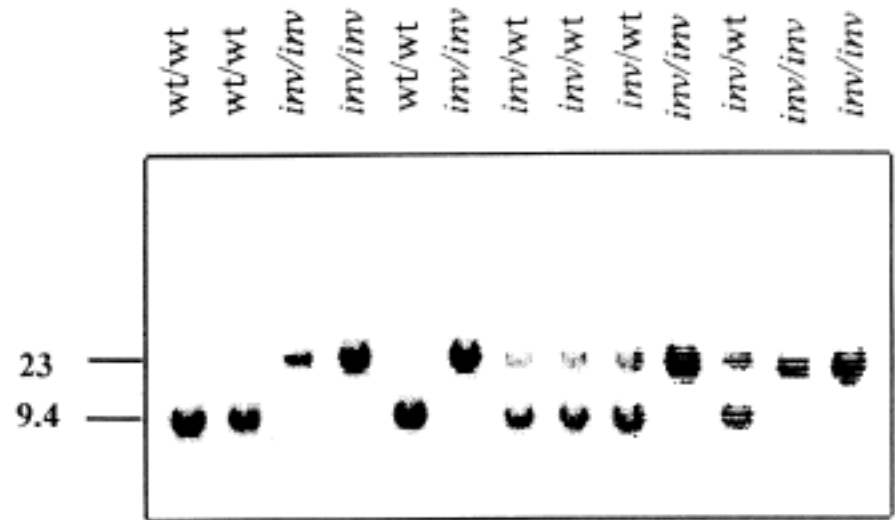


Fig. 1. Southern hybridization on fetuses reveals a band at 18 Kb for homozygotes, two bands at 9.2 Kb and 18 Kb for heterozygotes and a band at 9.2 Kb for nontransgenic mice.

를 probe로 Southern hybridization하면 동형접합체는 18 Kb에 하나의 보합결합띠 (hybridization band)를 갖고 있었고 이형접합체는 18 Kb와 9.2 Kb에 각각 한개씩 두개의 띠를 갖고 있으며 비유전자이식마우스는 9.2 Kb에 하나의 띠를 갖고 있었다 (Fig. 1).

3. 형태학적 관찰을 위한 표본처리

임신 10.5일에서부터 16.5일에 이르는 배아는 정둔장 길이가 5~13 mm 사이로 매우 작아서 전체를 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하였고, 17.5일과 18.5일에 이르는 태아와 생후 7일까지의 생쥐에서는 양측 신장을 떼내어 포르말린에 고정하였고 파라핀 포매 후 5 µm 두께로 박절하고 탈파라핀을 한 후 헤마톡실린-에오진 염색을 시행하여 광학 현미경하에서 관찰을 하였다. 필요에 따라 Masson-trichrome 및 PAS염색을 시행하였다. 전자현미경적 검사를 위한 표본은 9.5일~18.5일 사이의 태아기에 있는 신선한 신조직을 1 mm³ 크기로 잘라 3% 글루탈 알데하이드 용액에 고정하고 osmium tetroxide로 후고정하였고 (본과정까지는 주사형 전자 현미경적 검색 시료에서도 동일함), 이폰에 포매한후 1 µm 두께로 초박절하여 톨루이딘 블루 염색을 하였다. 관찰하고자 하는 표본을 초박절하여 uranyl acetate-lead citrate염색후 Hitachi 7100으로 관찰한다. 주사형 전자현미경용 시료의 고정은 전자현미경과 동일한 고정을 하였으며 osmium 처리후 에탄올과 carbon dioxide를 이용하여 표본을 건조시키고 gold palladium으로 막을 씌워 진공발화기에서 처리하였다.

4. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색은 파라핀 포매된 신조직을 이용하였으며 4 µm두께로 박절하고 탈파라핀 및 합수과정을 거친 후 5분간 마이크로 웨이브에서 구연산완충액을 넣고 끓인 후 통상의 peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 법으로 일차, 이차 항체를 처리하였고 diaminobenzidine으로 발색하고 헤마톡실린으로 대조염색을 시행하였다.

양성 대조로는 사전 실험에서 각각의 항체가 발현하는 정상 신조직을 이용하였고 음성 대조로는 일차항체를 반응시키지 않은 상태에서 위의 과정을 진행하였다. 낭의 기원을 확인하기 위하여 네프론의 각 분절에 특이하게 반응하는 상피세포의 표지자로 다음과 같은 항체들을 사용하였다. 근위세뇨관에 특이하게 반응하는 항체로 두 개의 페록시다아제가 붙어 있는 렉틴 *Tetragonolobus purpureas* (TP; Sigma, 1 : 200)와 *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin* (PHA-E; Sigma, 1 : 1000)을 사용하였고, 원위세뇨관에 반응하는 항체로는 렉틴 *Arachis hypogaea* (AH; Sigma, 1 : 50) 이외에, AE1/AE3 (Zymed, 1 : 50), epithelial membrane antigen (EMA; Dako, 1 : 50), vimentin (Dako, 1 : 80)을 사용하였으며, 헨레환의 두터운 상행각 (thick ascending limb of Henle's loop)에 특이하게 반응하는 Tamm-Horsfall protein (THP; Cedarlane, 1 : 10)을 이용하였다.¹² 면역조직화학적 염색은 태령 15.5일 이후의 신조직에 시행하였다.

5. 형태학적 관찰

정상 신과 다낭신의 출생전 발달과정을 연령에 따라 비교 관찰하였다. 광학현미경하에서 낭의 출현시기, 낭에 의해 침범된 네프론의 위치, 낭의 신실질내 분포 및 기타 동반된 이상소견의 유무 등을 관찰하였다. 신세뇨관의 크기는 대조군과 다낭신에서 연령 별로 화상분석기 (IVAS, Zeiss)를 이용하여 측정하였다. 신세뇨관의 크기는 내강의 단경으로 정하였고 각 연령별로 평균값과 중간값을 구하였다. 다낭신의 낭의 크기는 연령별로 형태 계측기를 이용하여 측정하여 평균값을 구하였다. 신실질에서 낭이 차지하는 퍼센트를 구했고 또한 사구체 낭이 차지하는 비율은 분화가 완료된 전체 사구체 수중 낭성 변화를 보인 사구체 수의 백분율로 표시하였다. Hitachi 7100 투과현미경을 이용하여 8예에서 (태령 16.5일 1예, 18.5일 3예, 생후 1일 3예, 생후 7일 1예) 낭으로 침범된 신세뇨관 상피세포의 미세구조의 이상을

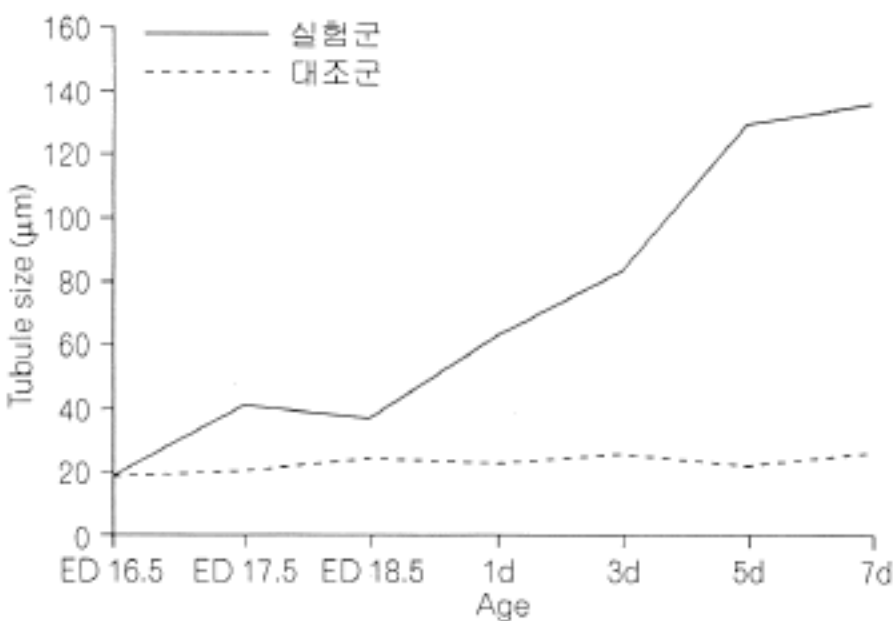


Fig. 2. Mean size change of renal tubules from polycystic and control kidneys with age. ED: embryonic day

대조군과 비교 관찰하였고 4예 (태령 18.5일, 생후1, 5, 7일 1예씩)는 주사현미경 (Hitach 2460N)을 이용하여 낭의 내면을 관찰하였다.

6. 세포 증식에 관한 연구

광학 현미경하에서 세포의 증식능을 객관적으로 평가하기 위하여 proliferation cell nuclear antigen (PCNA; Dako, 1 : 1200)을 이용한 PAP법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. PCNA 증식능은 신세뇨관 상피세포의 핵을 1000개 세어서 그 중 양성으로 반응한 핵의 수를 백분율로 표시하였다.

성 적

1. 정상 신의 출생전 발달

신은 태령 11.5일에 요관썩 (ureteric bud)의 원위부가 확장되고 주변으로 후신발생아 (metanephric blastema)가 둘러싸면서 만들어지기 시작하였고, 12.5일에 후신은 비뇨생식능선 (urogenital ridge)의 미단부 (caudal part)에 위치하며 요관썩이 원시신우를 형성하면서 하나 또는 몇 개의 분지를 내어서 큰술잔 (major calyx)의 원기를 형성하였다. 13.5일에 신장의 피질부에서 많은 수의 원시낭포와 수질부에는 간엽조직과 미분화된 세뇨관이 관찰되었다. 14.5일에 피질과 수질의 경계가 좀더 뚜렷해졌고 피질의 내측에 원시사구체가 관찰되기 시작하였고 수질은 미분화간엽조직으로 구성되었으며 소수의 집합관이 관찰되었다. 신피막의 직하부에는 미분화 후신조직이 대부분을 차지하고 있었다. 15.5일에 좀더 분화된 원시사구체는 Bowman 피막을 갖고 있었고 신장



Fig. 3. Gross appearance of polycystic kidneys from mice at 18.5 days of intrauterine life (left), 3 days (middle) and 5 days of life (right). The kidney before birth is almost normal in size and shape. (left kidney was already removed). After birth, the kidneys are progressively enlarged with preservation of reniform shape and filling the abdominal cavity.

의 바깥 1/3에 위치하였고 집합관은 벽이 얇아지고 방사선 배열을 하면서 신우로 연결되었다. 16.5일에 신장의 모양이 둥글어지고 피질과 수질의 경계가 전주에 비해 명확해졌고 사구체는 피질의 주변부에 위치하면서 주변으로 소수의 근위부 및 원위부 극세뇨관이 관찰되었고 수질은 미분화된 간엽조직과 방사성 배열을 하고 있는 집합관으로 구성되었고 미분화후신조직이 피질 직하부에서 관찰되었다. 17.5일에 피질에 분화된 사구체와 많은 수의 근위부 및 원위부 극세뇨관이 관찰되었고 수질부에는 집합관과 많은 수의 헨레관으로 구성되었다. 작은 신장술잔 및 큰술잔들이 명확하게 관찰되었다. 18.5일은 17.5일과 거의 동일한 소견을 보이나 아직 신피막 직하부의 소량의 미분화 후신조직을 갖고 있었고 이는 출생직후까지 남아 있다가 곧 소실되었다.

2. 다낭신의 형태학적 연구

연령별로 실험군과 대조군의 신세뇨관의 크기를 화상분석기를 이용하여 측정한 결과 평균 및 중간 값은 Fig. 2와 같다. 대조군에서는 태령 16.5일에서부터 생후

7일까지 신세뇨관의 평균값은 19~25 μm 로 전 연령에 걸쳐 30 μm 이하였으나 실험군에서는 16.5일에 19 μm 에서부터 18.5일에 42 μm 로 2배 가량 커졌으며 출생후 그 크기가 급격히 증가되어 생후 3일에 83 μm , 5일에 130 μm , 생후 7일째 212 μm 였다. 이상의 소견을 근거로 세뇨관의 크기가 40 μm 이상일 때를 낭으로 정의하였으며 사구체낭은 Bowman space가 40 μm 이상 확장된 것으로 정의하였다. 육안적으로 출생전에는 신장의 크기와 모양의 변화가 거의 없어 대조군과 차이가 없었으나 출생후 양측 신장이 모양을 유지하면서 대칭적으로 커져서 생후 3일에 복강의 2/3 이상을 차지하였고 생후 7일에는 복강 전체를 차지하고 있었으며 신피막하에 위치한 많은 수의 낭을 쉽게 볼 수 있었다 (Fig. 3). 신실질내 낭이 차지하는 비율과 전체 사구체중 낭성 변화를 보인 사구체의 백분율을 연령에 따라 비교해 보면 Fig. 4와 같다. 태령 16.5일부터 극소수의 신세뇨관에서 낭성

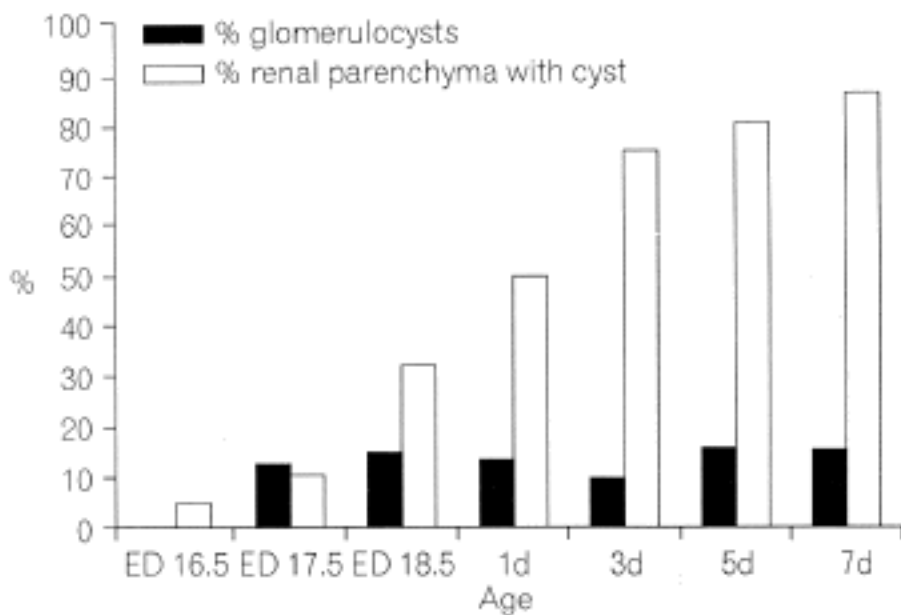


Fig. 4. Percentage of renal parenchyma and glomeruli involved by cysts in polycystic kidneys with age.

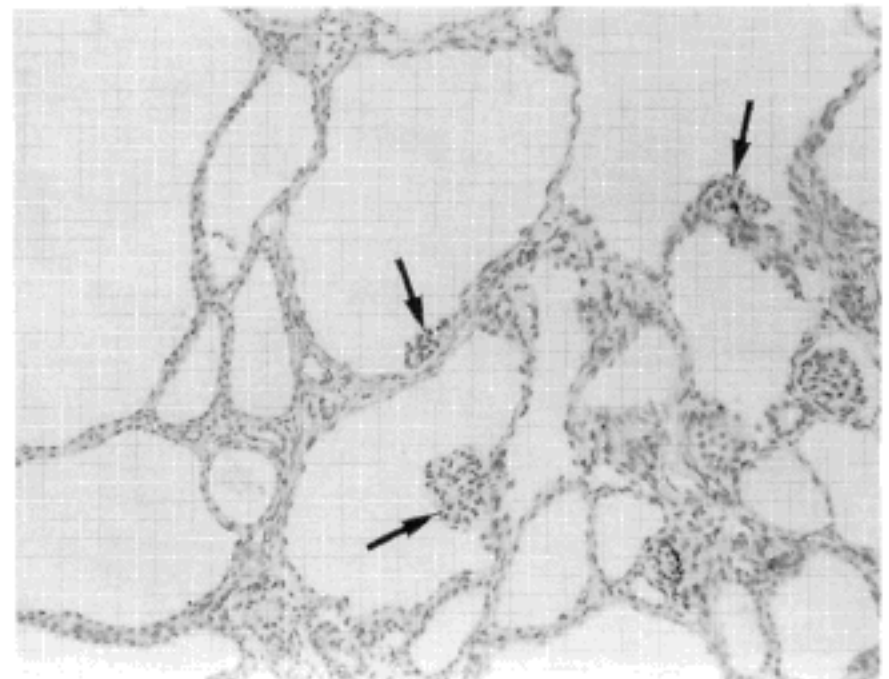


Fig. 5. The polycystic kidney from 1 day of age shows glomerulocysts containing capillary tufts (arrows) within the dilated Bowman space.

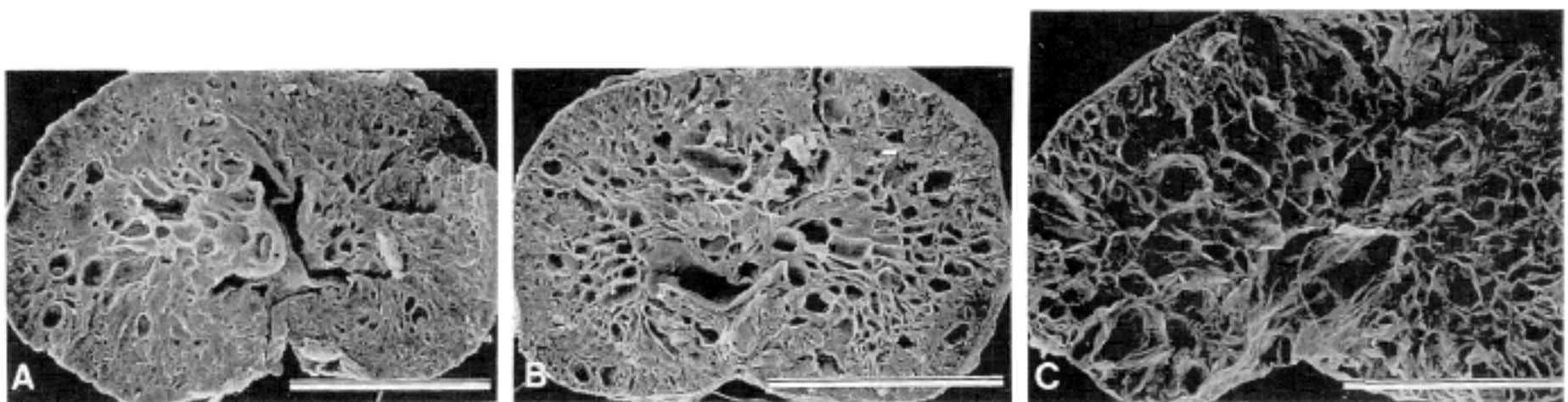


Fig. 6. Scanning electron micrographs of cut surface of polycystic kidneys. A: embryonic day 18.5 (bar=1 mm), B: postnatal day 3 (bar=2 mm), C: postnatal day 7 (bar=2 mm). The cysts are preferentially located in the inner part of the renal cortex and medulla in fetal period (A) and later, in postnatal period the kidneys are progressively enlarged due to mainly cystic change of the collecting ducts (B). Number and size of cysts are greatly increased and the renal parenchyma is almost completely replaced by cysts (C). The cysts are round and range from 40 μm up to 500 μm in diameter.

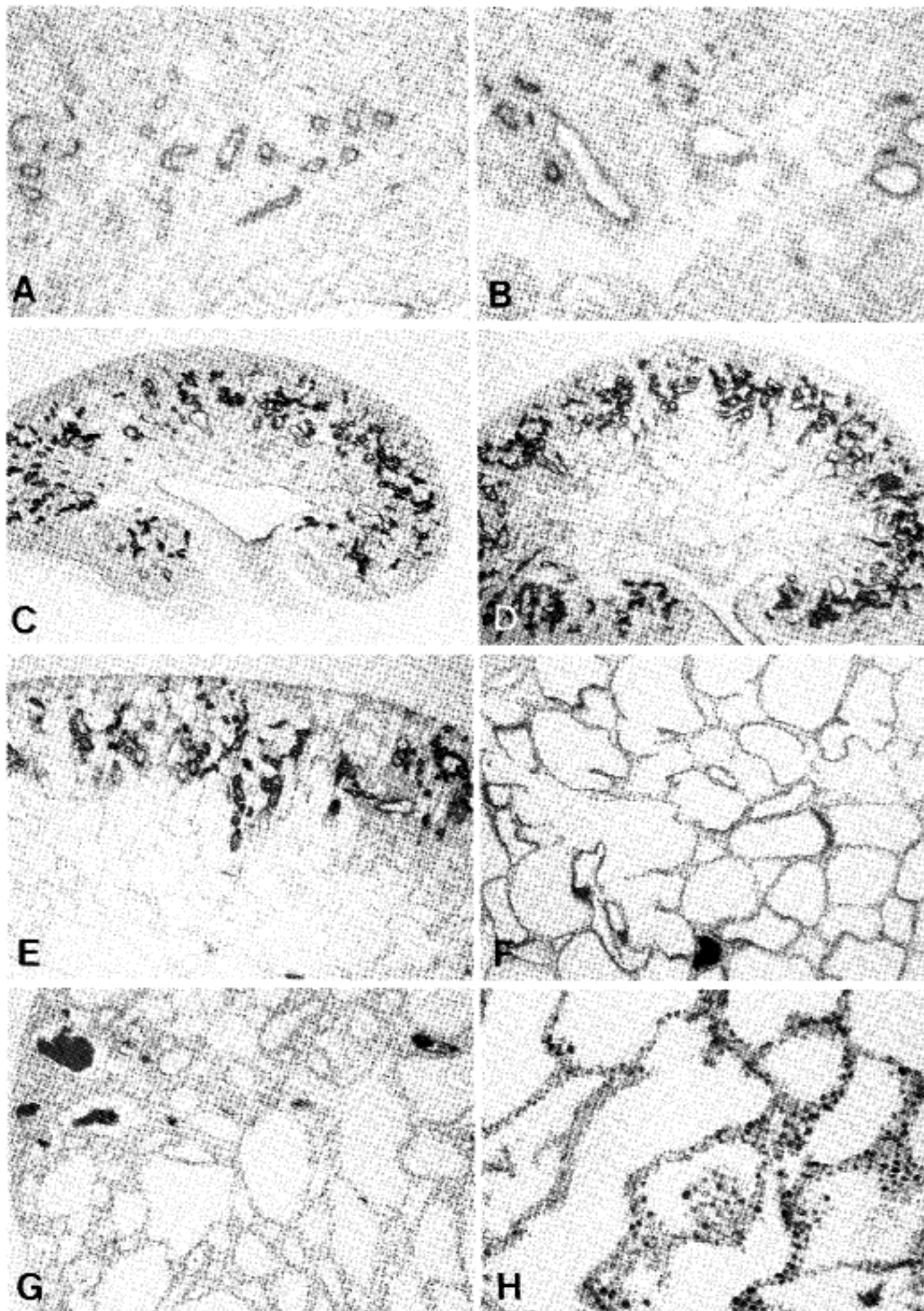


Fig. 7. Immunostains with (A-E) *Tetragnolobus purpureas* (TP), (F) *Arachis hypogaea* (AH), (G) Tamm Horsfall protein (THP) and (H) PCNA. Photographs of normal (A) and cystic (B) kidneys from embryonic day 16.5 mice show developing proximal tubules (A) and cystic change (B) with a strong reaction along the brush border of the epithelial lining cells. Cystic kidneys from ED 18.5 (C) through 1 day (D), 3 day (E-F) and 5 day (G) of age. The inner cortical proximal tubules are mainly dilated at 18.5 days of intrauterine life. In 1 day of life most tubules are located in the medulla and are not reactive for TP. The subcapsular nephrogenic zone remains (D). The renal cortex and medulla are completely replaced by the numerous cysts (E) and the majority of cysts are distal tubules, which are strongly reactive for AH (F). THP staining shows a strong positivity of the few cystic epithelium (G). Note numerous PCNA positive nuclei in the cystic epithelial cells and polypoid hyperplasia of the lining epithelium, which is intensely stained (H).

변화가 관찰되었고 출생전에는 낭이 신실질의 10% 미만을 차지하고 있었으나 출생후 연령이 증가함에 따라 점차 낭이 차지하는 비율이 증가되어 생후 7일째에는 신실질의 90% 이상이 낭으로 대체되어 있었다. 낭의 모양은 둥글거나 난원형이었고 크기는 40~500 μm 까지 다양하였다. 사구체낭은 태령 17.5일에 처음 관찰되기 시작하였고 생후 7일에 이르기까지 전 연령에 걸쳐 전체 사구체의 10~15%가 낭성변화를 하였다. 사구체낭의 크기는 매우 다양하였고 출생후 연령이 증가함에 따라 그 크기가 증가하여 낭성변화를 보인 신세뇨관과 동일한 정도까지 커져 있었으나 낭벽에 붙어 있는 사구체를 확인함으로써 신세뇨관과 쉽게 구분되었다 (Fig. 5). 신실질내 낭의 분포를 보면 태령 16.5일에는 피질의 내측에 국한되었으나 17.5일째부터 수질에서도 소수의 낭이 관찰되었고 18.5일에는 피질보다 수질내 낭성 변화가 우세하였으나 점차 피질내 낭의 수가 증가함에 따라 생후 3일째부터 수질과 피질에 고르게 분포하였으며 신피막 직하부 피질까지 낭이 침범하였다 (Fig. 6).

각종 렉틴에 대한 면역조직화학적 염색 결과 태령 16.5일에 신피질의 내측에서 관찰된 낭은 근위세뇨관에 특이한 TP에 강하게 반응하였으며 전 연령에 걸쳐 TP에 반응하는 근위세뇨관의 약 10~15%가 낭성변화를 보인 반면 연령이 증가함에 따라 낭의 대부분은 집합관을 포함한 원위세뇨관에 특이하게 반응하는 항체들 (AE1/AE3, EMA, AH)에 염색되었으며 THP 항체에 염색되는 헨레환의 두터워진 상행각에서 기원한 낭도 소수 관찰되었다. 낭내부를 채우고 있는 분비물의 일부는 THP 항체에 반응하였다 (Fig. 7A-G).

3. 다낭신에서 관찰된 광학 및 전자 현미경적 이상 소견

실험군에서 낭성변화 이외에 관찰된 조직학적 이상 소견들은 Table 1에 요약하였다. 17.5일에서부터 신세뇨관의 상피세포의 과증식이 관찰되었는데 증식된 상피

세포들은 고행성으로 세뇨관의 내강을 완전히 막고 있거나 세뇨관 내강쪽으로 돌출된 용종의 형태를 취하였다 (Fig. 7H). 그 외에 신세뇨관내 석회화는 생후 3일에서부터, 사구체경화와 간질내 섬유화는 생후 5일째부터 관찰되었고 낭주변부의 평활근 세포의 증식은 뚜렷하지 않았다. 투과전자현미경에서 관찰된 이상 소견은 신세뇨관 상피세포의 증식이 18.5일에서 부터 관찰되었고 세뇨관 및 사구체 기저막의 비후 또는 다른 이상 소견은 관찰되지 않았다. 낭성변화를 하고 있는 세뇨관은 근위 및 원위세뇨관과 집합관들로서 세포질내 미세구조들은 잘 유지되어 있었으나 일부에서 상피세포간 간격의 확장, basolateral interdigitation의 감소, 쉼자연 (brush border)의 소실 및 apical bleb 등이 흔히 동반되었는데 이들은 낭성변화에 의한 이차적인 변성으로 해석하였다. 주사현미경으로 낭의 내면을 관찰하였는데 낭의 내부에서 포도송이 모양으로 돌출되어 있는 증식된 상피세포들의 덩어리가 흔히 관찰되었고 이들은 낭벽과 연결되어 있었다 (Fig. 8A). 그 외에 낭성변화에 이차적인

Table 1. Histologic abnormalities found in the kidneys with polycystic disease

Age	Epithelial proliferation	Tubular calcification	Glomerulo-sclerosis	Interstitial fibrosis
ED 16.5	-	-	-	-
ED 17.5	+	-	-	-
ED 18.5	+	-	-	-
PND 1	+	-	-	-
PND 3	+	+	-	-
PND 5	+	+	+	+f
PND 7	+	+	+	+f

ED: embryonic day, PND: postnatal day, f: focal

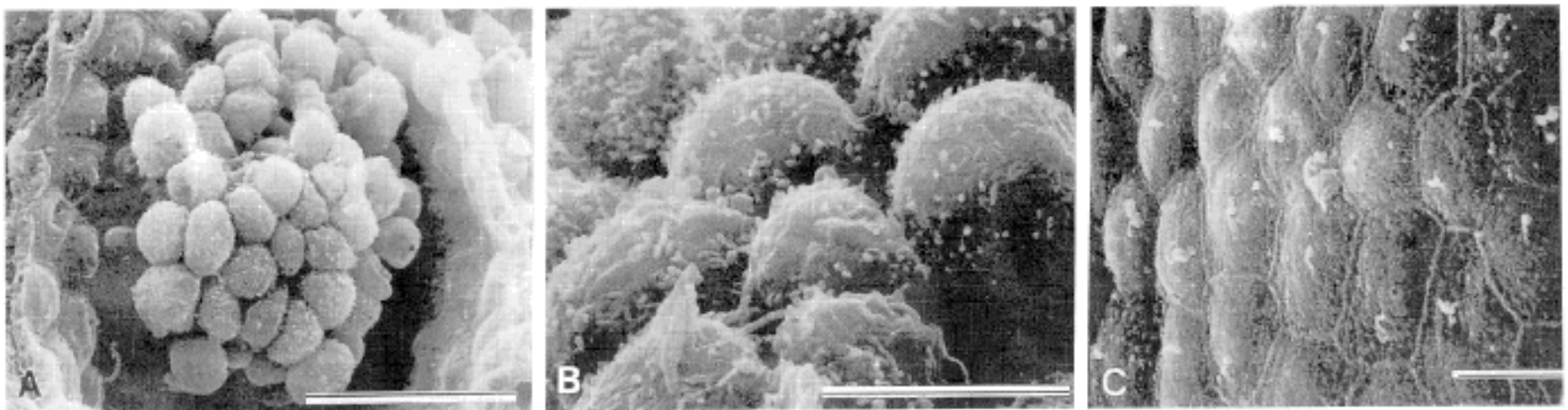


Fig. 8. Scanning electron micrographs of lining tubular cysts. (A) an epithelial micropolyp along the wall of proximal tubular cyst is found (X2,000, bar=20 μm). (B) intact and rarefied proximal tubular brush borders can be seen in the cyst ($\times 10,000$, bar=5 μm). (C) cystic epithelium of the proximal tubules resembling the outer medullary collecting duct with few microvilli and a prominent cilium is noted. ($\times 3,000$, bar=10 μm)

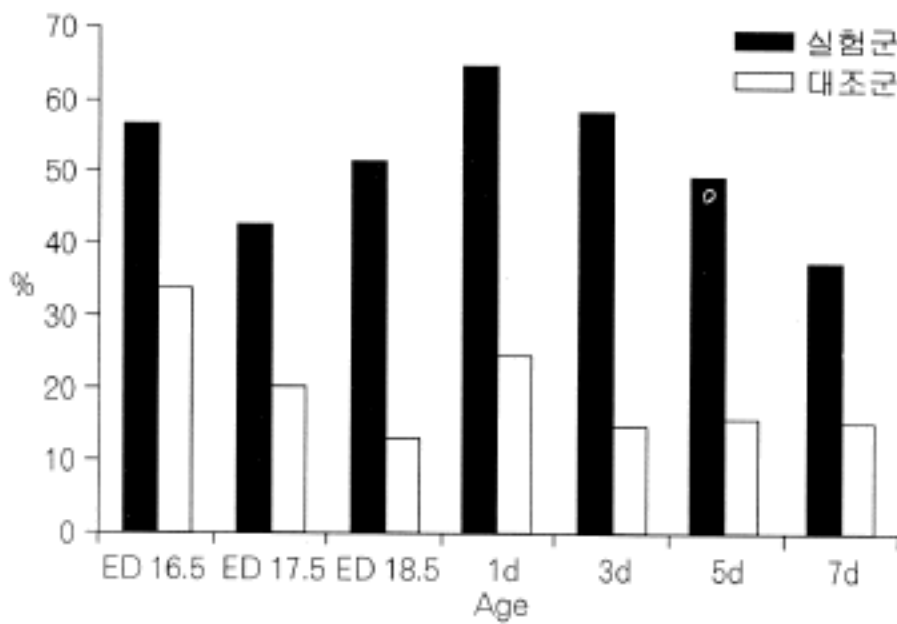


Fig. 9. Percentage of PCNA positive nuclei in the tubular epithelial cells of polycystic and control kidneys with age.

쇄자연의 소실과 상피세포의 표면이 마치 거북이 등모양을 하고 있어 집합관의 표면과 유사하게 보였다 (Fig. 8B-C).

4. 세포증식능

PCNA 발현율은 대조군에 비해 실험군에서 현저하게 증가되었고 연령별로는 16.5일에서부터 출생 전까지 점차 증가하여 생후 1일에 가장 높은 세포증식능을 보였고 (Fig. 7H) 그 이후 다시 감소하기 시작하였다 (Fig. 9).

고 찰

본 연구에서 관찰된 다낭신의 낭성변화는 근위 및 원위세뇨관이 발달되기 시작하는 출생전 태령 16.5일에 신피질의 내측에 위치한 근위세뇨관의 확장으로 시작되어 다낭성 신질환은 정상 신세뇨관의 발달과 밀접한 관련을 갖고 태생기부터 발생하는 선천성 질환임을 확인하였고 형태학적으로 크게 출생전과 출생후 변화로 구분되었다. 출생전 다낭신의 낭성변화는 주로 근위세뇨관의 확장이 주종을 이루었고 소수의 사구체낭과 원위세뇨관 기원의 낭이 섞여 있었으며 육안적인 이상 소견은 관찰되지 않아 대조군의 신장과 구별되지 않았다. 그러나 출생후 낭은 원위세뇨관과 집합관의 확장이 주종을 이루었고 소수의 헨레환의 두터운 상행각 기원의 낭도 관여하였다. 낭은 출생전에는 주로 신피질에서 관찰되었으나 출생후 피질과 수질에 고루 분포하여 신실질의 90% 이상을 차지하였다. 낭의 크기는 출생전 40 μ m에서 출생후 7일째 500 μ m까지로 출생후 연령이 증가함에 따라 급격한 크기의 변화를 보였고 육안적으로 양측 신장이 대칭적으로 커지면서 3일째부터 피질 직하부에서 둥근 모양의 낭이 관찰되었다. 낭의 기원을 확인하기 위하여 신세뇨관의 분절에 특이하게 반응하는 렉틴을 이용한 면역조직화학 염색에서 대부분의 낭은 AH에 반응하는 집합관을 포함한 원위세뇨관으로 구성되

었으나 TH에 반응하는 근위세뇨관, THP에 반응하는 헨레환 기원의 낭과 소수의 사구체낭이 관찰되었는데 이런 소견은 문헌에 기술되어 있는 상염색체우성 (성인형) 다낭성 신질환에서 관찰되었던 소견들과 매우 유사하다.² 상염색체우성 다낭성 신질환은 원위 및 근위세뇨관, 헨레환 및 사구체 등의 이질성 기원의 낭으로 구성되어 있는 반면 상염색체열성 다낭성 신질환은 대부분 집합관의 확장으로 되어 있고 때로는 곡세뇨관이 미약하게 확장되기도 하나 사구체낭은 관찰되지 않는다.¹³ 유전성 다낭성 신질환에서 낭의 기원에 관한 연구는 현미수술 (microdissection), 렉틴에 대한 면역조직화학 염색, 전해질농축, 전자현미경 등 다양한 방법들이 이용되고 있으나 그 결과는 거의 비슷하다.¹⁴⁻¹⁷ 전자현미경을 이용한 성인형 다낭성 신질환의 연구에 의하면 신세뇨관의 기저막의 비후를 기술하면서 낭성변화를 보인 신세뇨관의 기저막은 망상형 또는 체모양으로 두터워져 있으나 낭으로 침범되지 않은 신세뇨관의 기저막은 균질하게 두터워지므로 기저막의 변화가 다낭성 신질환의 병인임을 주장하였다.¹⁸ 그러나 본 연구에서는 신세뇨관의 기저막의 비후 및 이상 소견을 관찰할 수 없었다. 문헌에 보고된 다낭성 신질환의 신세뇨관의 기저막에 관한 기술은 일관성이 없으며 사람의 성인형 다낭성 신질환에 관한 연구는 대부분 질환의 말기에 적출된 신장을 대상으로 하였음을 고려한다면 기저막의 변화는 말기 신부전증 환자에서 관찰되는 이차적인 변화일 가능성도 배제할 수 없다. 사람의 다낭성 신질환의 출생 전 연구에 관한 기술은 문헌에서 찾아 볼 수 없었고 임신 14주와 19주된 태아의 다낭성 이형성신질환에 대한 렉틴 면역조직화학염색에서 Bowman 강, 집합관, 근위세뇨관을 포함한 네프론의 모든 부분에서 기원함을 시사하였다.¹⁹ 사람에서 상염색체열성으로 유전되는 다낭성 신질환은 유아 및 소아에서 발생하는 유전성 신질환의 가장 흔한 형태로 유아형 다낭성 신질환으로 불리는 반면, 상염색체우성으로 유전되는 다낭성 신질환은 주로 성인에서 발병되므로 성인형 다낭성 신질환으로 불리나 아주 드물게 주산기에 양수과소증 연쇄와 함께 발병되므로 양막음모의 DNA분석과 초음파가 산전진단에 이용되고 있다.²⁰⁻²¹ 유아에서 발생하는 성인형 다낭성 신질환은 정상이거나 크기가 커지고 육안적으로 둥근 모양의 다양한 크기의 낭이 신수질과 피질에 분포하며 현미경적으로 네프론의 모든 분절에서 기인한 낭으로 구성되어 있으며 특징적으로 사구체낭이 있으며 정상 신실질을 많이 함유하며 신우와 요관은 정상적으로 발달된다.²² 본 연구에서 다낭신은 육안적으로 신장의 형태를 유지하면서 양측성으로 커졌고 둥근 형태의 다양한 크기의 낭이 수질과 피질에 걸쳐 관찰되었으며 요관, 신우 및 방광은 정상적으로 발달되었고 비정상적인 교원질의 증식은 관찰되지 않았다. 즉 육안 및 현미경 소견과 면역조직화학적 소견들은 사람의 유아에서 발생하는 상염색체우성 다낭성 신질환과 매우 유사하여

사람의 상염색체우성의 다낭성 신질환의 실험동물모델로 적합한 것으로 사료된다. 그러나 실험군을 확보하는데 많은 어려움이 있었다. 이는 *inv* 돌연변이 유전자에 대한 동형접합체 생쥐는 출생직후 1~2일 이내 곧 사망하므로 실험군을 확보하기 위해서는 OVE210 유전자이식마우스중 이형접합체 암수를 유지 번식시켜야 하였고 약물 또는 다른 환경에 의한 이차적인 기형 유발인자의 개입을 배제하기 위하여 일주일에 1회 자연교미를 시켰으며 동형접합체의 발생빈도가 임신한 암컷을 도살하여 얻은 배아 및 태아중 25%로 낮아서 실험군을 확보하는데 많은 시간이 소요되었다. 또한 동형접합체 생쥐는 대부분 출생직후 하루이내에 사망하였고 사망 즉시 부모 생쥐들에 의해 제거되므로 출생직후의 실험군을 제외하고는 2일 이상된 실험군을 확보할 수 없었다. 이 문제를 해결하기 위하여 OVE210 유전자이식마우스를 ICR 생쥐와 교배시켜서 *inv* 유전자에 대한 교잡생쥐를 만들었더니 생후 7일까지 생존하는 것이 있어 생후 1일 이상된 실험군은 ICR 생쥐와 교잡하여 만든 교잡생쥐로 3일, 5일, 7일째된 생쥐를 확보하였다.

지금까지 알려진 다낭성 신질환의 병인에 관한 연구는 diphenylamine, diphenylthiazole, nordihydroquaiaretic acid 등을 쥐에 투여하여 유발된 다낭신을 대상으로 하였고 그 외에 *in vivo* 모델로서 *cpk* 유전자, *pcy* 유전자를 갖고 있는 쥐에서 성인형 또는 유아형 다낭성 신질환의 유전방식에 관한 연구가 있고, 유전자이식마우스 모델로는 SV40-early region with large T antigen과 SV 40-myc 유전자이식마우스에서 신장의 낭성변화가 기술되어 있으나 형태학적 기술 이외에는 자세한 병인에 관한 연구는 이루어지지 않았다.²³⁻²⁷ 최근에 *bcl-2* $-/-$ 생쥐에서 사람의 상염색체우성의 다낭성 신질환이 보고되면서 규제 받지 않고 증식된 세포의 과증식이 병인으로 주목받고 있다.²⁸⁻²⁹ 본 연구에서도 광학 현미경적으로 신세뇨관 상피세포의 과증식이 낭의 내강내로 돌출된 용종의 형태로 관찰되었는데 이들 증식된 세포들은 면역조직화학적 염색에서 렉틴에 반응하였고 전자현미경적으로 신상피세포의 형태학적 소견이 관찰되었다. PCNA를 이용한 면역조직화학적 염색에서 상피세포의 증식능이 대조군에 비해 실험군에서 현저하게 증가된 점 등은 신세뇨관 상피세포의 과증식이 다낭신의 병인임을 시사하고 있다. PCNA 양성인 세포의 발현이 생후 1일에 최고치를 이루었다가 점차 감소되었는데 이는 다낭신의 발생이 정상 신발달과 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 즉, 정상적인 신발달이 출생직후까지 완성되지 않고 피막하부에 미분화후신 조직으로 남아 있기 때문이다.

상염색체우성 다낭성 신질환에 관여하는 유전자에 대한 연구가 활발해져 최근까지 적어도 세종류의 유전적 이상이 관여한다고 알려져 있다.³⁰⁻³¹ 첫 번째 돌연변이 (PKD-1)는 16번 염색체 (16p13.3)에 있고 두 번째 돌연변이 (PKD-2)는 4번 염색체 (4p13-p23)에 위치하나 PKD-3의 유전자 위치는 아직 확인되지 않았다. 이와 같

은 다양한 유전자형 (genotype)이 다양한 표현형의 다낭성 신질환을 유발하는 것으로 추정되고 있다. 본 연구의 실험군이 가지고 있는 *inv* 유전자는 생쥐 염색체 4번의 근위부에 위치하며 *v-mos* oncogene homology (MOS), thyrotropin α subunit (*Tsha*), *tenascin*으로 알려진 *hexabrachion* 유전자에 근접해 있으나 아직 유전자의 클론이 완성되지 않아 *inv* 유전자와 다낭성 신질환과의 관련성을 확인할 수 없었다.

결 론

유전적 다낭성 신질환을 가지고 있는 *inv* 돌연변이 유전자에 대한 동형접합체 생쥐에서 다낭신의 발생과정과 병인을 확인하기 위하여 출생전후에 걸쳐 생쥐의 신장에 대한 형태학적 연구를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

다낭신의 발달은 형태학적으로 크게 두 단계로 구분되었다. 제 1단계는 태아기로 신세뇨관이 발달되기 시작하는 태령 16.5일에 신피질의 내측에 위치한 근위세뇨관의 확장으로 시작되어 소수의 원위세뇨관이 확장되며 신세뇨관 상피세포의 세포증식능 (PCNA 발현율)의 증가가 뚜렷하였다. 제 2단계는 출생후 변화로 주로 집합관의 낭성변화가 주종을 이루고 낭은 신피질과 수질 전체에 걸쳐 분포하였고 낭의 크기와 신장의 크기가 급격히 커졌으나 세포증식능은 점차 감소하였다. 면역조직화학 및 전자현미경적으로 낭성변화는 집합관을 포함한 네프론의 모든 분절을 침범하였고 사구체낭도 관여하였다. 신상피세포의 과증식은 낭의 내부에서 용종의 형태로 관찰되었으며 PCNA 양성물의 증가로 나타났다. 이상의 소견은 다낭성 신의 낭성변화는 단순한 신세뇨관의 확장 또는 기저막의 변화에 의한 것이 아니라 세포수의 증가에 의한 것임을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Glassbey KI, Stephens FD, Lebowitz RL, et al. Renal dysgenesis and cystic disease of the kidney: a report of the committee on terminology, nomenclature and classification section on urology, American Academy of Pediatrics. *J Urol* 1987; 138: 1085-92.
2. Fraggiana T, Bernstein J, Strauss L, Churg J. Use of lectins in the study of histogenesis of renal cysts. *Lab Invest* 1985; 53: 575-9.
3. Zerres K, Volpel MC, Weiss H. Cystic kidneys. Genetics, pathologic anatomy, clinical picture and prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1984; 68: 104-35.
4. Bernstein J, Evan AP, Gardner KD. Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney disease. *Am J Pathol* 1987; 129: 92-101.
5. Evan AP, Gardner KD, Bernstein J. Polypoid and papil-

- lary epithelial hyperplasia. A potential cause of ductal obstruction in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1979; 16: 743-50.
6. Avner ED, Sweeney WE Jr, Young MC, Ellis D. Congenital murine polycystic kidney disease. II. Pathogenesis of tubular cyst formation. *Pediatr Nephrol* 1988; 2: 210-8.
 7. Carone FA, Hollenberg PF, Nakamura S, Punyarit P, Glogowski W, Flouret G. Tubular basement membrane change occurs pari assu with development of cyst. *Kidney Int* 1988; 35: 1034-40.
 8. Carone FA, Makino H, Kanwar YS. Basement membrane antigens in renal polycystic disease. *Am J Pathol* 1988; 130: 466-71.
 9. Ebihara I, Killen PD, Laurie GW, et al. Altered mRNA expression of basement membrane components in a murine model of polycystic kidney diseases. *Lab Invest* 1988; 58: 262-9.
 10. Evan AP, Gardner KD. Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease. *Kidney Int* 1979; 15: 7-19.
 11. Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA, Montgomery CA, Elder FF, Overbeek PA. Reversal of left-right asymmetry: A situs inversus mutation. *Science* 1993; 30: 679-82.
 12. Fraggiana T, Bernstein J, Strauss L, Churg J. Lectin peroxidase conjugate reactivity in normal human kidneys. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 451-8.
 13. Verani R, Walker P, Silva FG. Renal cystic disease of infancy: results of histochemical studies. A report of the Southwest Pediatric Nephrology Study Group. *Pediatr Nephrol* 1989; 3: 37-42.
 14. Osathanondh V, Potter E. Pathogenesis of polycystic kidneys. *Arch Pathol* 1964; 77: 459-64.
 15. Baert L. Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early state of the disease. *Kidney Int* 1978; 13: 519-25.
 16. Cuppage FE, Huseman RA, Chapman A, Grantham JJ. Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys. *Kidney Int* 1980; 17: 372-81.
 17. Huseman R, Grady A, Welling D, Grantham J. Macro-puncture study of polycystic disease in adult human kidneys. *Kidney Int* 1980; 18: 375-85.
 18. Carone FA, Nakamura S, Caputo M, Bacallao R, Nelson WJ, Kanwar YS. Cell polarity in human renal cystic disease. *Lab Invest* 1994; 70: 648-55.
 19. Matsell DG, Bennett T, Goodyer P, Goodyer C, Han V. The pathogenesis of multicystic dysplastic kidney disease: insight from the study of fetal kidneys. *Lab Invest* 1996; 74: 883-92.
 20. Zerres k, Weiss H, Bulla M, Roth B. Prenatal diagnosis of an early manifestation of autosomal dominant adult-type polycystic kidney disease. (letter) *Lancet* 1982; 2: 988.
 21. Reeders ST, Zerres K, Gal A, et al. Prenatal diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease with a DNA probe. *Lancet* 1986; 2: 6-8.
 22. Gilbert-Barness E. *Potter's pathology of the fetus and infant*. St. Louis: Mosby, 1997: 883-4.
 23. Gattone VH, Grantham JJ. Understanding human cystic disease through experimental models. *Semin Nephrol* 1991; 11: 617-31.
 24. Preminger GM, Koch WE, Fried FA, McFarland E, Murphy ED, Mandell J. Murine congenital polycystic kidney disease; A model for studying development of cystic disease. *J Urol* 1982; 127: 556-60.
 25. Takahash H, Calvet JP, Dittmore-Hoover D. A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. *J Am Soc Nephrol* 1991; 980-9.
 26. Kelly KA, Agarwal N, Reeder S. Renal cyst formation and multifocal neoplasia in transgenic mice carrying the similar virus 40 early region. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 84-97.
 27. Gattone VH, Calvet JP, Cowley BD, et al. Autosomal recessive polycystic kidney diseases in a murine model. A gross and microscopic description. *Lab Invest* 1988; 59: 231-8.
 28. Herrera GA. C-erb B-2 amplication in cystic renal disease. *Intern Soc Nephrol* 1991; 40: 509-13.
 29. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75: 229-40.
 30. Kimberling WJ, Pieke-Dahl SA, Kumar S. The genetics of cystic disease of the kidney. *Semin Nephrol* 1991; 11: 596-606.
 31. Wilson PD. Cell biology of human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol* 1991; 11: 607-16.