

가토의 항-사구체기저막 항체에 의한 사구체신염에서 기질단백 mRNA의 연속적 변화에 관한 연구

한양대학교 의과대학 병리학교실, ¹울산대학교 생명과학부,
²한림대학교 의과대학 내과학교실

박문향 · 이언화¹ · 한인섭¹ · 전노원² · 노정우²

Sequential Changes of Extracellular Matrix mRNA in Anti-GBM Antibody Induced Crescentic Glomerulonephritis in the Rabbit

Moon Hyang Park, Unn Wha Lee¹, In Sup Han¹, Rho Won Chun², and Jung Woo Noh²

Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-792, Korea

¹Department of Biological Science, University of Ulsan

²Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hallym University

Progressive renal fibrosis is considered to be the final common pathway leading to chronic renal insufficiency, however, the mechanism regarding renal fibrosis in renal injury is not well understood. Recently, several kinds of cytokines have been known to be related to fibrosis after renal injury. The interaction between elements regulating fibrogenesis would be better understood by looking at the effect of TGF- β 1 on the synthesis and accumulation of extracellular matrix, especially collagenous proteins. Crescentic glomerulonephritis (CGN) was induced in New Zealand White rabbits by administration of guinea pig anti-GBM IgG after sensitization with guinea pig IgG; and their kidneys were analyzed for the development of crescents and fibrosis through sequential renal biopsies. Serum creatinine levels in a time course progressively increased until day 15. We semi-quantitatively assayed the levels of the expression of α 1(I) collagen mRNA and TGF- β 1 mRNA factored for GAPDH mRNA using RT-PCR. We observed a progressive interstitial fibrosis and the expression of collagen I both in the cortex and medulla. The effect of repeated renal biopsy itself on pathology and on the expression of α 1(I) collagen mRNA and TGF- β 1 mRNA in a time course were not significant, but a very mild increase of the expression of α 1(I) collagen mRNA was noted at day 15. Histology showed a progressive crescent formation and interstitial fibrosis in a time course that roughly paralleled the expression of α 1(I) collagen mRNA in both cortex and medulla. TGF- β 1 mRNA was hardly expressed at day 0 in cortex as well as in medulla. It was elevated from day 1, peaked at day 7, and then decreased. In medulla, TGF- β 1 mRNA was noticeably expressed at day 1, peaked at day 4, and then decreased. The expression of α 1(I) collagen mRNA was seen even before inducing CGN. It was gradually and continuously increased until day 15 both in cortex and medulla. These results suggest that the expression of TGF- β 1 mRNA precedes that of α 1(I) collagen mRNA in the early stage of CGN and has a central role for provoking the accumulation the collagen I, the most representative interstitial extracellular matrix, in the rabbit model CGN induced by anti-GBM antibody. We conclude that the measurement of the expression of TGF- β 1 mRNA and/or α 1(I) collagen mRNA in a biopsy sample can be a useful predictor for renal outcome. (**Korean J Pathol 1998; 32: 627~637**)

Key Words: Anti-GBM disease, Fibrosis, Extracellular matrix mRNA, Collagen I, TGF- β

접 수: 1998년 6월 2일, 게재승인: 1998년 8월 6일

주 소: 서울시 성동구 행당동 17번지, 우편번호 133-792, E-mail: parkmh@email.hanyang.ac.kr, 한양대학교 의과대학 병리학교실, 박문향

ISSN : 0379-1149

*본 연구는 한국과학재단 핵심전문 (961-0712-074-2) 연구비에 의하여 이루어졌음.

서 론

여러 형태의 신 손상에서 신부전으로 진행되는 것은 사구체의 경화와 더불어 간질에 진행되는 섬유화로 인해 신 기능이 저하되어 결국 만성 신부전으로 진행하게 된다.¹ 간질 섬유화는 신 손상의 여러 가지 원인에 무관하게 말기 신으로 진행되는 가장 유용한 예측인자이다.^{2,3} 말기 신으로 진행되면 투석을 하거나 신 이식을 하는 고가의 치료를 받아야 할 뿐더러 이병률과 사망률이 매우 높다.⁴ 이런 신 섬유화의 진행을 예방하는 방법이 있다면 환자를 치료하는 중요한 방법으로 이용될 것이다. 임상적인 정보로 신장의 기능적인 검사들이 이용되고 있으나 이런 신 기능 검사도 덜 예민하고 한계가 있음이 지적되고 있다.⁵ 또한 신 생검을 시행하여 형태학적 변화의 반 정량적인 분석을 시행하여 병의 만성도와 활성도를 알아보고 예후를 예측하려는 시도가 루프스 신염에서 제안되었고 널리 사용하고 있으나⁶ 이 역시 전향적인 연구에서 예측인자로서의 가치가 한계가 있다는 문제를 제기하기도 하였다.⁷ 그러나 루프스 신염에서 간질 염증의 심한 정도가 신부전과 연관성이 있고 신기능 저하의 중요한 예후의 지표라고 하여 사구체의 변화뿐 아니라 간질의 변화에 관심을 갖게 되었다.⁸ 여러 사구체질환이나 세뇨관 간질성 질환에서 예후 인자들에 관한 연구들이 시도되었고, 이중 IgA 신병증도 임상소견과 조직학적인 소견을 반 정량적으로 분석하여 세뇨관 간질의 변화도 하나의 예후 인자로서 의의를 보여 주었다.⁹ 그러나 최근에는 임상적 정보와 신생검에서 얻은 정보의 한계점을 보완하려는 시도가 이루어지고 있다.¹⁰ 이중 사구체에서 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)의 변화를 측정하여 병의 진행에 예후 예측인자로 사용할 수 있음을 시사하였고 이런 ECM의 축적과 섬유화에 관여하는 인자들의 mRNA량을 분자생물학적인 방법을 사용하여 측정한 실험적 연구들이 있다.¹¹⁻¹³

여러 동물에서 항 사구체 기저막 항체에 의한 사구체 신염의 모델이 연구되었고 그 형태학적인 연구와 이때 관여하는 염증세포들과 여러 cytokines들의 역할에 대해서도 연구하고 있다.^{14,15} 항cytokine이 전신성 염증반응 증후군의 치료에 새로운 치료전략으로 이용될 가능성도 주장하였다.¹⁶ 가토의 항사구체기저막 질병의 모델에서 반월상 사구체신염이 유발되면 후기에 현저히 간질 섬유화가 일어나게 되고 신기능이 현저히 저하된다.¹⁴ 이런 경우 사구체내 염증이 주로 있는 초기에 이미 사구체의 collagen I 과 IV의 mRNA의 증가가 일어난다고 하였다.^{12,17} 이런 섬유화를 유발하는데 관여하는 세포에 대해서도 논란이 되고 있어, in situ hybridization으로 연구한 보고에서는 사구체 주변의 collagen $\alpha 2(I)$ mRNA의 발현이 혈관주위 세포에서 증가되어서 아마도 이런 세포에서 간질섬유화가 유발되고 이때 사구체의 보우만 피막의 파괴된 부분을 통하여 간질

성 collagen이 유입된다고 주장하였다.¹⁸ Jones등¹⁹은 rat에서 급성 puromycin aminonucleoside 신염에서 TGF- β 의 mRNA가 증가되고 간질성 기질단백질인 제 I형 collagen과 fibronectin 그리고 기저막 제 IV형 collagen의 유전자를 나타내는 mRNA의 증가를 보여주었다. 아울러 기질의 분해 (degradation)를 방해하는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)에 대한 mRNA가 증가된 후 원래 치로 돌아가는 소견을 보여주었다.

이때 시행한 in situ hybridization으로 $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA는 간질세포에서 발현되었다.

사구체신염에서 성장인자들의 상호작용과 간질 섬유화에 관여하는 여러 가지 cytokine들이 알려져 있고 이중 중요한 매개체로 작용하는 TGF- β 는 세포의 증식을 억제하고 세포부착을 촉진한다. TGF- β 의 이런 작용이 ECM성분의 합성과 침착을 촉진하고 단백용해를 저하하고 이는 integrins으로 알려진 세포-부착 수용체들의 변화 등에 의해 수행된다. TGF- β 는 fibronectin, $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ chain의 제 I형 collagen과 제 III, V, VI형 collagen 등의 많은 기질단백질의 발현을 증가시킨다. 이외에도 osteopontin, osteonectin, tenascin, thrombospondin, biglycan과 decorin의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁻²³ 이는 간질에 침윤된 염증세포에서 기인하여 증가될 것으로 생각하고 있다.¹⁹ Border등²⁴은 동물실험으로 collagen합성을 유도하는 주된 매개체인 TGF- β 의 기능을 차단하는 항TGF- β 를 투여하거나, decorin 유전자 치료법을 이용하여 현저한 효과를 보여주었다.

ECM의 중요한 성분인 간질성 교원질인 제 I형 collagen과 이를 침착하는데 강력한 자극을 주는 TGF- $\beta 1$ 의 mRNA를 측정하여 시기에 따른 변화를 비교하는 연구가 필요하다. 그러나 이런 과정이 한 동물에서 시간에 따라 어떻게 진행되는지에 대한 연속적인 연구는 거의 없다. 본 연구자들은 앞서 토끼의 항 사구체 기저막 질병의 모델에서 시기별로 동물을 희생하여 사구체의 반월형성의 경시적 변화를 형태학적으로 연구하였고,²⁵ 본 연구에서는 한 동물에서 일정 시기에 연속적인 신 생검을 시행하여 형태학적인 변화와 분자생물학적인 기법으로 세포외기질 중 대표적인 간질성 교원질인 $\alpha 1(I)$ collagen의 변화를 신 피질과 수질을 나누어서 비교하고, 이를 조정하는 유전자인 TGF- $\beta 1$ 의 변화를 동시에 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 병의 유발

실험 동물은 체중 2.0~2.5 kg의 웅성 뉴질랜드 백색 가토 (Newzealand white rabbit) 7마리를 실험 대상으로 하였다. 실험 동물은 독립된 사육장 한 칸에 한 마리씩 배정하였으며 동일한 조건하에 사육하였다. 대조군으로 3마리는 질병을 유발하지 않은 채 연속적 생검의 영향에 대한 대조군으로 사용하였고, 실험군인 여섯 마리의

가토는 발병 전을 연속적인 생검의 일환으로 일차 생검을 시행하였고, 병을 유발한 후 계속하여 연속적인 생검을 시행하였다. 기니픽 anti-rabbit GBM IgG (University of Michigan의 Dr. Wiggins로부터 제공 받음)를 100 μ g의 기니픽 IgG (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 동량의 complete Freund's adjuvant를 섞은 후 양측 어깨와 둔부 네 군데에 피하로 주사하여 항 사구체 기저막 항체에 의한 반월성 사구체신염을 유발하였다. 5일후 기니픽에서 만든 항 가토 사구체 기저막에 대한 항혈청 IgG 50 mg씩 정맥 주사하였다.

2. 혈액의 채취 및 신조직 생검

가토의 귀 정맥에서 23게이지 주사기를 사용하여 혈액 2 mL를 채취하여 Jaffe 반응 법에 의해 혈청 크리아티닌치를 측정하였다.

신생검은 백색가토를 Xylazine (Rumpum, Bayer, 5 mg/Kg)과 Ketamin (Ketara, 유한양행, 10~15 mg/Kg)을 피하 주사로 마취시킨 후, 가토의 복벽을 열어 신장을 체외로 노출 시켰다. 신장의 양쪽 극 (pole)부위에서 부분적 신 절제로 신 조직을 얻었으며 지혈이 확인되면 신장을 다시 복강 내로 집어넣어 복벽을 봉합하는 방법을 반복하였다. 대조군 및 발병군은 발병 제 1일, 4일, 7일, 15일까지 수술적 생검 (open biopsy)한 후 제 45일에 희생하였다. 생검한 조직의 일부를 10% 중성 formalin과 일부는 paraformalin에 고정하였고, 면역형광현미경 검사를 위해 일부를 OCT 액에 넣어 -70°C 에 보관하였다. 나머지를 신 피질과 신 수질로 나누어 액체질소에 순간 동결시켜 -80°C 에 보관하여 RNA추출에 사용하였다.

3. 광학현미경적 검사

Formalin에 고정 후 통상의 방법으로 파라핀에 포매한 조직을 4 μ m로 박절하여 hematoxylin-eosin, PAS, Masson's trichrome염색을 시행하였다. 사구체의 반월형성 정도와 세뇨관의 변화, 간질의 섬유화의 정도와 혈관의 변화를 반 정량적으로 분석하였다. 사구체 반월형성의 정도는 100개 이상의 사구체를 검색하여 초기, 세포성, 섬유세포성, 섬유성 사구체의 수를 세어서 대략적인 반월성 사구체의 백분율을 기록하였다. 세뇨관 간질의 변화는 세뇨관 위축, 간질의 염증세포 침윤과 섬유화를 주로 관찰하여 변화가 없으면 정상 (0), 면적의 약 25% 이하인 경우는 정도 (+), 25~50%는 중등도 (++) , 50% 이상이면 심한 정도 (+++)로 구분하였다.

4. 면역형광현미경적 검사

면역형광염색은 신선한 신 절편을 OCT 액에 넣고 급냉동하여 -80°C 에 보관한 후 cryostat으로 4 μ m 두께로 동결 절편하여 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG와 C3 (Cappel Laboratory, Durham, NC, USA)를 사용하여 직접 면역형광 염색 방법으로 염색하여 형광현미

경으로 관찰하였다.

5. 조직에서 total RNA 추출

냉동고에 보관하였던 조직을 dry ice위에서 잘게 나눈 후 한 개의 조직 약 1 gram 당 0.6 mL Solution D에 0.6 mL의 2-mercaptoethanol을 섞은 용액에 0.6 mL phenol을 첨가하여 homogenizer에 넣어 분쇄하였다. 세포가 완전히 파괴되었을 때 0.12 mL의 chloroform과 0.06 mL의 2M sodium acetate (pH 4.0)를 첨가하여 좀더 분쇄하였다. 이들을 새로운 튜브에 옮겨 얼음 위에서 약 30분정도 놓아 둔 후 4°C , 14,000 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮기고 중간층이 사라질 때까지 phenol/chloroform (1:1) 용액 0.6 mL을 넣어 위의 과정을 반복하였다. 최종 부피의 0.6 mL에 해당하는 양으로 차가운 무수 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 -20°C 에서 3시간 이상 침전시킨 후 약 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 다음 상층액을 버리고 70% ethanol로 행군 후 가볍게 침전물을 말려 적당량의 DEPC 처리된 증류수에 녹여서 사용하였다.

6. 반 정량적 RT-PCR 수행

정제된 total RNA를 poly-dT primer와 annealing 시킨 후 AMV reverse transcriptase (USB)를 사용하여 first strand cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 가지고 각각의 해당 primer set를 써서 PCR을 수행하였다. 사용된 primer는 주문 합성하였으며 염기배열은 다음과 같다.

Primer sequence used for RT-PCR

Rabbit α 1(I) collagen: sense 5'GATGTGCCACT CTGACTGG 3'

Rabbit α 1(I) collagen: antisense 5'ACATCGATG TGGGCAGGC 3'

TGF- β 1: sense: 5'CTGTACATTGACTTCCGAAG 3'

TGF- β 1: antisense: 5'ATCATGTTGGACAGCTG CTCC 3'

GAPDH: sense 5'TCACCATCTTCCAGGAGCG 3'

GAPDH: anti-sense 5'CTGCTTACCACCTTCTT GA 3'

PCR 기계는 Perkin Elmer (U.S.A)를 사용하였고 제작회사에서 제안한 방법으로 수행하였다. 이때의 PCR 용액의 구성은 1~3 μ l template (cDNA 용액)에 1 μ l의 primer -5' (2 mM), 1 μ l의 primer-3' (2 μ M), 1 μ l의 dNTP 혼합액 (2 mM each), 1 μ l의 10 \times Buffer (20 mM MgCl₂, Takara), 1 μ l의 Taq polymerase (Takara, 5 U/ μ l)를 넣어 증류수를 가하여 20 μ l의 용액을 만들었다. PCR 조건은 TGF- β 1의 경우 pre-denaturation은 94°C 5분, denaturation은 94°C 1분, annealing은 55°C 1분, elongation은 72°C 30초로 30주기 시행한 후 최종 postelongation은 72°C 7분으로 하였다. α 1(I) collagen

의 경우는 대개 동일하였으나 annealing은 57°C 1분, elongation은 72°C 1분으로 하였다. GAPDH의 경우도 annealing은 59°C 1분으로 하여 시행하였다. 각 기간의 TGF-β1와 collagen I mRNA 발현을 비교하기 위하여 각 생검 조직에서 분리한 RNA를 가지고 반 정량적인 RT-PCR을 시행하였다. 이때 GAPDH에 대한 실험을 먼저 시행하여 그 결과에 따라 cDNA template의 양을 조정하여 다시 PCR을 시행하여 GAPDH의 PCR 산물의 양이 일정하게 된 것을 확인하였고, 그 이후의 PCR은 조정된 cDNA template의 양으로 시행하였다. 그리고 조정된 양의 cDNA template를 사용하여 TGF-β1과 α1(I) collagen에 대한 각각의 primer로 PCR을 수행하여 각각의 PCR 산물의 양을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 예상된 크기의 분자에 해당하는 band에서 분석하고 확인하였다.

7. 통계학적 분석

실험기간 동안 연속적으로 얻은 혈청 크리아티닌 치, 사구체 반월 형성 백분율 및 간질섬유화의 정도 등 측정된 결과는 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 혈청 크리아티닌 (serum creatinine) 치

혈청 크리아티닌치는 발병전 대조군 (0일)에서는 평

균 1.06±0.18 mg/dL이었고 발병 제 1일에는 0.98±0.08 mg/dL로 정상이었다. 발병 제 4일에는 1.55±0.47 mg/dL, 제 7일에는 2.05±0.62 mg/dL, 제 15일에는 2.88±1.16 mg/dL, 그리고 제 45일에는 4.05±2.32 mg/dL로 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (p<0.05) (Table 1).

2. 광학현미경적 소견

1) 사구체의 반월 형성 정도: 대조군에서는 전 실험기간을 통하여 특별한 병변이 관찰되지 않았다. 사구체의 반월형성 정도는 Table 2에 요약하였다. 항체 투여군에서는 제 4일부터 평균 46.7% 정도의 사구체에서 세포성분의 증가와 Bowman's space 내에 내피세포의 종창 및 단백질성 물질과 섬유소, 적혈구, 소수의 염증세포 등이 출현하는 초기 반월 형성의 소견이 관찰되기 시작하였고 (Fig. 1C), 제 7일에는 변화가 현저하여 56%에서 초기 및 세포성 반월 형성이 관찰되었다 (Fig. 1D). 제 15일에는 약 70%로 심하였고 (Fig. 1E), 제 45일에는 반월 형성이 진행되어 약 58%의 사구체에서 섬유세포성 또는 섬유성 반월들이 관찰되었다. 이때는 Bowman's space의 단백질이나 섬유소들은 거의 소실되었고 Bowman's space의 파괴로 사구체 주변의 섬유화가 뚜렷하였고 전체적인 사구체 경화 (global sclerosis)는 평균 5% 정도에서 관찰되었다. 부분적인 세뇨관 위축, 세뇨관 내강의 확장, 간질의 부종 및 섬유화, 단핵세포가 주로 된 염증세포 침윤이 심하게 침범된 사구체들 주변이나 간질에서 뚜렷이 관찰되었다 (Fig. 1F). 즉 대조군 및 발병 제 1일

Table 1. The serial changes of serum creatinine level after induction of crescentic glomerulonephritis in rabbits

Day \ Rabbit	A	B	C	D	E	F	Mean ± SD
0	1.1	0.8	1.2	1.3	1.0	1.0	1.06 ± 0.18
1	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1	0.9	0.98 ± 0.08
4 ^a	1.1	1.2	1.5	2.4	1.7	1.4	1.55 ± 0.47
7 ^a	1.2	1.3	2.5	2.5	2.4	2.4	2.05 ± 0.62
15 ^a	1.7	1.5	3.8	2.6	4.4	3.3	2.88 ± 1.16
45 ^a	2.3	1.6	5.2	2.8	7.9	4.5	4.05 ± 2.32

^a: statistically significant in comparison with control group (p<0.05)

Table 2. Estimated percentage of glomeruli with crescent formation after induction of crescentic glomerulonephritis in rabbits

Day \ Rabbit	A	B	C	D	E	F	Mean ± SD
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0
4 ^a	0	40	50	80	60	50	46.7 ± 26.6
7 ^a	30	40	85	80	40	60	55.8 ± 22.9
15 ^a	9	40	90	70	60	70	70.0 ± 19.0
45 ^a	70	30	70	60	40	80	58.3 ± 19.4

^a: statistically significant in comparison with control group (p<0.05)

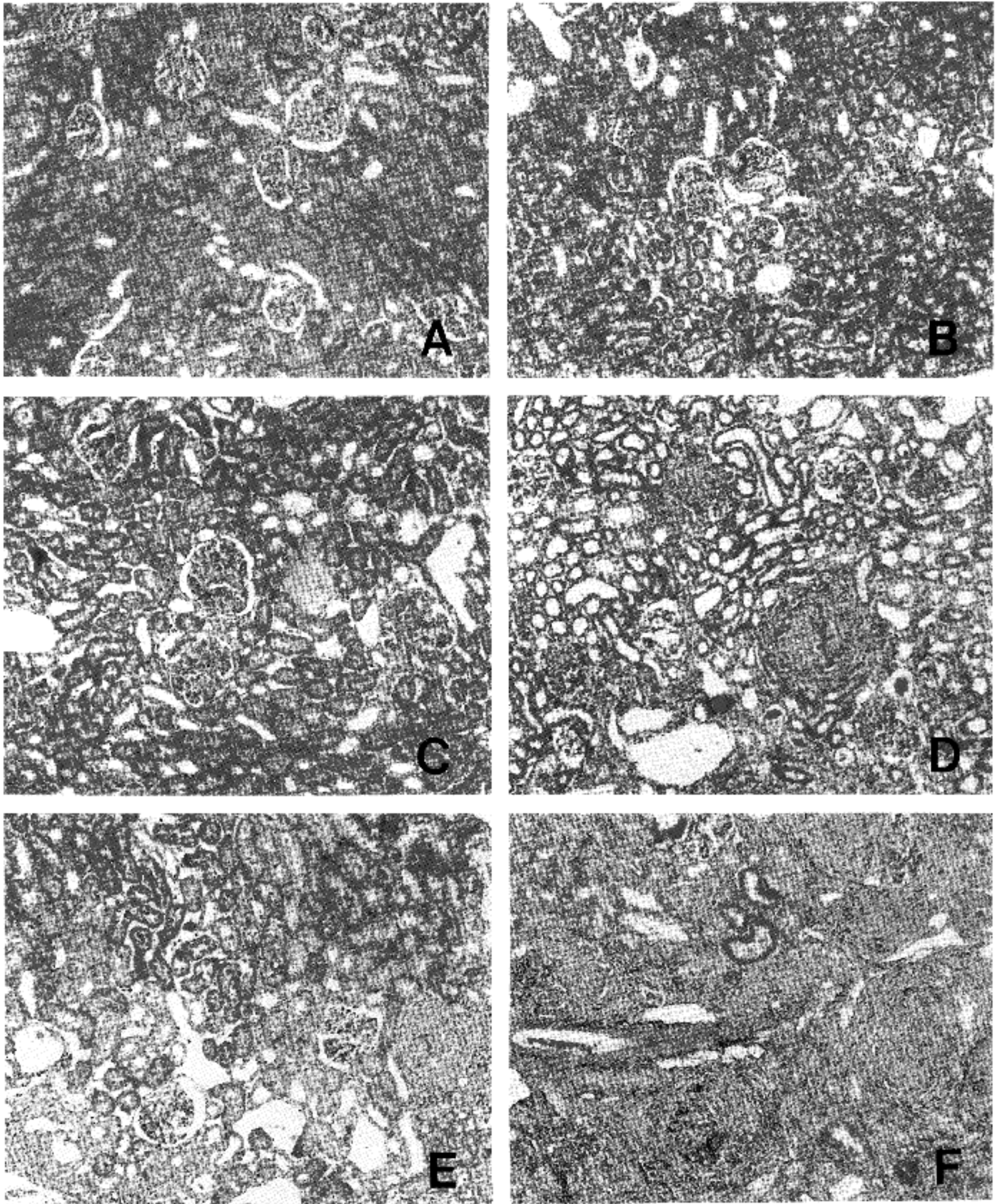


Fig. 1. Masson trichrome-stained sections of kidney from rabbits. Normal appearing glomeruli and no interstitial change are seen in control rabbits (A) and at day 1 (B). The glomerular capillary lumina and Bowman's space are filled with abundant fibrin materials with early endo- and extra-capillary cell proliferation at day 4 (C). Note the cellular crescents and some periglomerular inflammation at day 7 (D), and the fibrocellular crescents with periglomerular fibrosis at day 15(E). At day 45, there are segmentally or globally sclerotic glomeruli with obliterated Bowman's spaces and loss of Bowman's capsule. Marked tubular atrophy and widespread interstitial fibrosis are observed(F).

까지는 신 조직내 특이한 변화가 없이 반월 형성도 없었고, 발병 제 4일에는 약 47%의 세포증식과 초기 반월형성이, 제 7일에는 56%, 제 15일에는 70%, 제 45일에는 58%의 반월 형성을 보였다.

2) 간질의 섬유화 정도: 대조군과 제 1일에는 간질의 섬유화가 전혀 관찰되지 않았으나 (Fig. 1A, B), 제 4일에는 병변이 보이는 사구체 주변의 소엽간 동맥 같은 작은 혈관주변이나 소수의 세뇨관 주변의 간질에서 국소적인 부종이나 초기 섬유화가 매우 드물게 인지될 정도였고 (Fig. 1C), 제 7일에는 혈관주변의 간질에서 국소적인 확장과 섬유화가 관찰되었다 (Fig. 1D). 제 15일까지는 부분적으로 경미하게 관찰되었으며 (Fig. 1E), 제 45일은 여러 곳에 섬유화를 보이는 간질에는 평균 중등도 (++)의 섬유화를 나타내었다. 신 피질의 사구체 주변에서 시작된 섬유화는 점차 신 수질 부위로 확장되었다 ($p < 0.05$) (Table 3) (Fig. 1F). 간질의 섬유화의 정도는 신 세뇨관의 위축이나 부분적인 내강 확장을 동반하였고 신수질의 간질 섬유화도 피질의 변화가 진행됨에 따라 점차 심해졌다.

3. 면역형광현미경적 소견

대조군은 IgG에 모두 음성이었다. 실험군 전 예에서

병일 제 1, 4, 7일에는 반월이 없는 비교적 잘 열린 사구체 모세혈관 벽을 따라 IgG가 선상으로 강하게 양성 반응을 보이고, 병일 제 15일과 45일에는 반월에 의해 모세혈관 고리가 밀리거나 내강이 좁아졌으나 사구체 모세혈관 벽을 따라 IgG가 양성으로 염색되었다 (Fig. 2A, B). C3도 비슷한 양상으로 양성으로 염색되었다.

Table 3. Degree of interstitial fibrosis after induction of crescentic glomerulonephritis in rabbits

Day \ Rabbit	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	+	0
15 ^a	+	+	+	+	+	+
45 ^a	++	+	+++	++	++	++

^a: statistically significant in comparison with control group ($p < 0.05$)

0: normal, +: minimal degree of fibrosis, ++: moderate degree, +++: severe degree

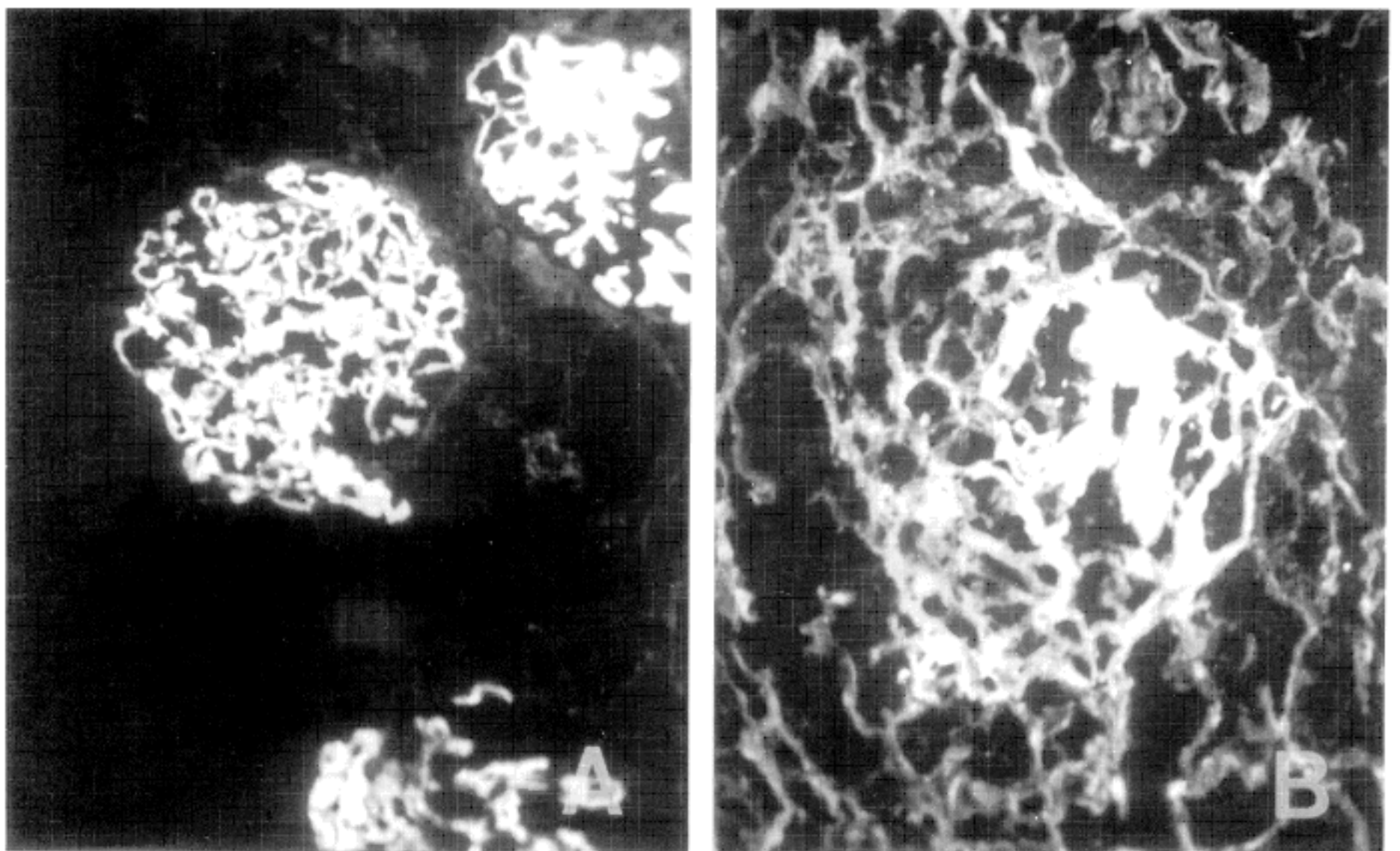


Fig. 2. Immunofluorescence(IF) microscopic findings. Linear IF staining for IgG along the glomerular capillary wall is evident at day 1 (A). The glomerular architecture is irregularly distorted and the glomerular tufts are displaced by crescents at day 15 (B) (IgG).

4. 발병 기간 별 TGF-β1과 α1(I) collagen mRNA 발현

1) 연속적 신 생검이 TGF-β1와 α1(I) collagen mRNA 발현에 미치는 영향: 질병을 유발하지 않고 연속적 신 생검을 시행한 대조군 3마리에서 α1(I) collagen과 TGF-β1 mRNA 발현은 각 병일 별 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 제 15일에 α1(I) collagen이 약하게 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3).

2) 신 피질과 신 수질에서 α1(I) Collagen mRNA 발현의 비교: 생검된 조직의 부위별 차이를 보기 위해 정상 대조군과 제 1일의 신 피질과 신수질의 α1(I) collagen mRNA는 모두 경한 발현을 보여 큰 차이가 없었다 (Fig. 4).

3) 발병후 신 피질과 신 수질에서의 α1(I) collagen과 TGF-β1 mRNA의 발현: 신피질에서 TGF-β1

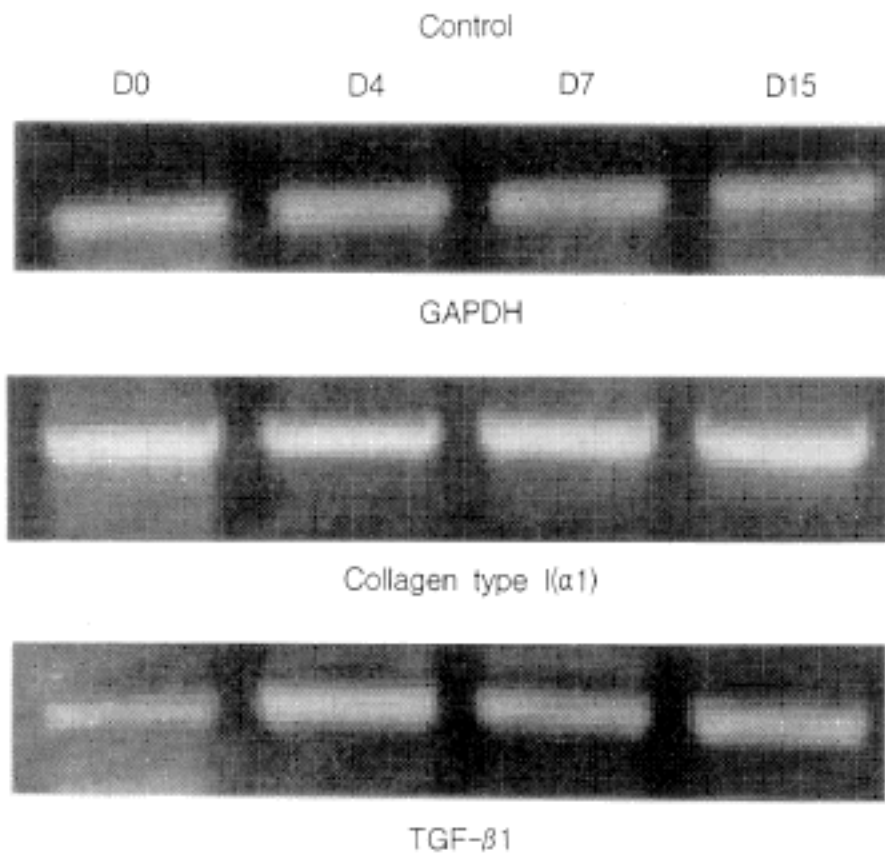


Fig. 3. Effect of sequential renal biopsy on the expression of TGF-β1 and α1(I) collagen mRNA in the cortex. The expression of α1(I) collagen mRNA and TGF-β1 mRNA were not significantly different in a time course except for very mild increase of the expression of α1(I) collagen mRNA at day 15.

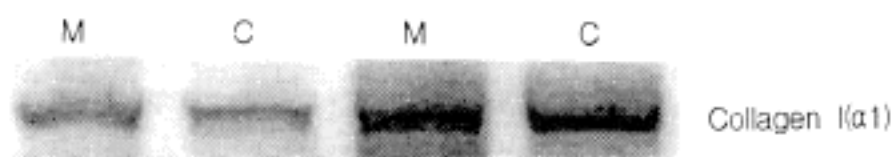


Fig. 4. Comparison of the expression of α1(I) collagen mRNA in renal cortical and medullary tissue at day 0 and day 1 in normal control and early nephritic kidney. No significant differences are seen between the cortex and medulla.

mRNA는 발병 유발 전에는 발현되지 않았으며, 제 1일에 매우 약하게 발현하였고 제 4일부터 뚜렷하게 발현된 후 제 7일까지 계속 증가하였고 제 15일에는 감소하였다. α1(I) collagen mRNA의 발현은 병일 제 1일부터 다소 증가하기 시작하였고 제 4일부터는 약간 증가하여 제 7, 제 15일까지 계속 증가하였다 (Fig. 5). 신 수질에서는 발병 전부터 TGF-β1 mRNA의 발현이 약하게 관찰되었고 제 1일에 뚜렷하게 증가되기 시작하여 제 4일에 최고치를 보인 후 제 7일 이후 감소하는 경향을 보였다. α1(I) Collagen mRNA의 발현은 병일 제 1

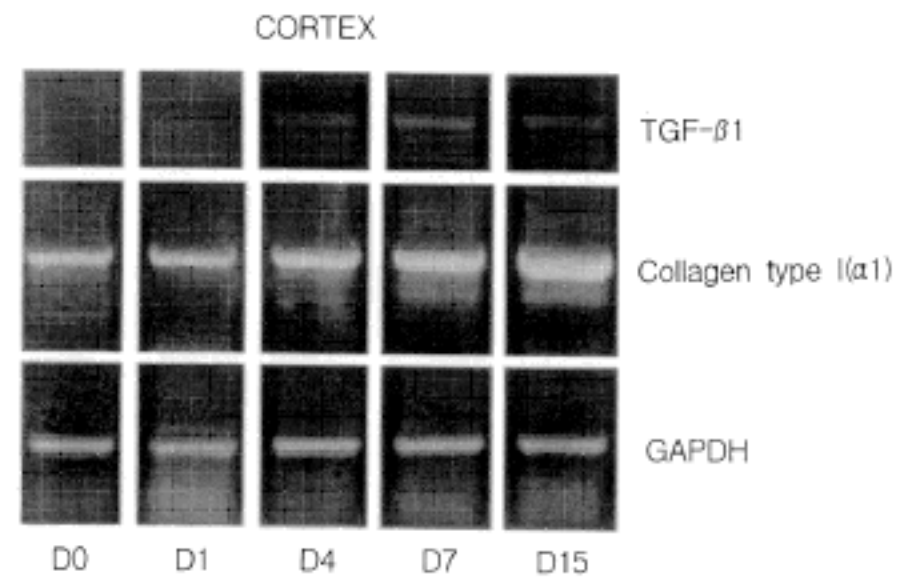


Fig. 5. Sequential changes of the expression of α1(I) collagen mRNA and TGF-β1 mRNA in cortex by semi-quantitative RT-PCR. TGF-β1 mRNA expression was elevated from day 1 and peaked at day 7 and then decreased. α1(I) collagen mRNA was expressed from day 0 control rabbit and increased successively until day 15, while the expression of GAPDH mRNA was constant in each time point.

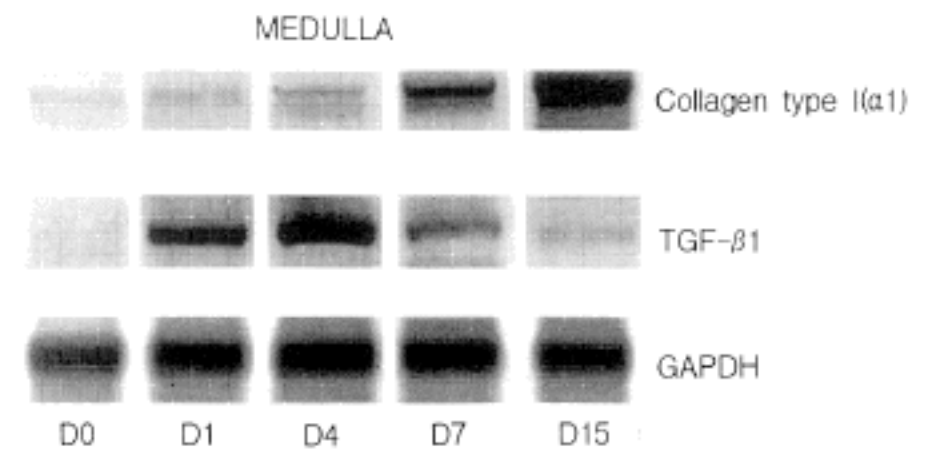


Fig. 6. Sequential changes of expression of α1(I) collagen mRNA and TGF-β1 mRNA in the medulla by semi-quantitative RT-PCR. TGF-β1 mRNA expression was elevated evidently from day 1 and peaked at day 4 but decreased from day 7. α1(I) collagen mRNA was expressed from day 0 in the control rabbit and increased successively until day 15, while the expression of GAPDH mRNA was constant at each time point.

일부터 다소 증가하기 시작하여 제 4일까지는 서서히 증가하였고 병일 제 7, 제 15, 제 45일까지 계속 증가하였다 (Fig. 6).

고 찰

진행성 신 섬유화는 만성 신부전을 유발하는 최종의 공통적인 귀결이다. 구조적인 변화인 사구체의 경화가 나타나고 더불어 세뇨관 위축이나 간질에 진행되는 섬유화로 인해 신 기능이 저하되고 결국 만성 신부전으로 진행된다. 최근에 사구체와 간질 섬유화의 병인에 대한 동물 모델^{19,26,27}이나 사람의 신 생검,^{28,29} 세포 배양^{30,31} 등을 이용한 연구가 이루어지고 있다. 임상적인 증례의 연구는 신 섬유화의 발생에 시간이 오래 걸리고, 대개 일단 섬유화가 발생되면 만성 신부전으로 진행을 방지하거나 치료하는 방법이 거의 효과가 없다. 섬유화를 조절하는 주된 인자들간의 상호작용은 섬유화의 중요 성분인 간질성 교원질의 합성이나 축적을 조사하는 것이 이 기전을 이해하는데 중요하다.

가토의 항 사구체 기저막 질병의 모델에서 반월상 사구체신염이 유발되면 현저히 간질 섬유화가 일어나게 되고 신 기능이 현저히 저하된다.¹⁴ 본 연구에서도 항 사구체 기저막 항체로 병을 유발한 후 제 4일에 채취한 혈청 크리아티닌이 평균 1.7 mg/dL로 증가되고 7일에는 2.1 mg/dL, 제 15일에는 2.9 mg/dL, 제 45일에는 4.1 mg/dL로 현저히 증가되어 신기능의 장애를 볼 수 있었다.

이때 시행한 조직 생검 상 제 4일에는 세포의 증식과 단백질성 물질이나 섬유소 등의 혈액성분이 파괴된 모세혈관사이로 보우만강으로 나와서 초기 반월형성의 소견이 나타났으며 평균 46.7%의 사구체에서 관찰되었다. 시간이 지남에 따라 세포성 반월에서 세포섬유성 반월이나 섬유성 반월로 진행하여 수가 증가되며 이때 사구체의 보우만 피막의 파열이나 소실이 되면서 사구체주변의 간질이나 혈관주변에 부종이나 섬유화가 나타났다. 제 7일에는 거의 관찰할 수 없었던 세뇨관의 위축과 간질 섬유화는 제 45일에 희생한 조직에서 현저하였다. 본 연구자들은 이미 토끼의 항 사구체 기저막 질병의 모델을 이용하여 시기별로 동물을 희생하여 사구체의 반월형성의 연속적인 형태학적 변화를 보고한 바 있다.²⁵ 반월형성의 정도나 양상은 기간에 따라 경시적으로 신장적출로 얻은 조직으로 연구한 것과 수술 생검으로 연구한 본 연구에서와 비슷하였으며, 이렇게 시도한 연속적인 생검의 결과는 비록 작은 조직을 검사하였지만 미만성의 변화이므로 전체 신 조직에서 보는 소견을 대치할 수 있을 것으로 생각되었다. 이와 같이 형태학적인 변화가 나타나기에 앞서 사구체내 염증이 주로 있는 초기에 이미 사구체의 제 I형 collagen과 제 IV형 collagen의 mRNA의 증가가 일어난다고 하였고,^{17,18} 이런 섬유화를 유발하는데 관여하는 세포에 대해서도 논란이 되고 있다. In situ hybridization으로 연구한 보

고에서는 간질세포¹⁹나 간질의 혈관주위세포¹⁸라고 생각하였고 이런 세포에서 간질섬유화가 유발되고 이때 사구체의 보우만 피막의 파괴된 부분을 통하여 간질성 collagen이 유입될 것으로 생각하였다.

본 연구에서의 대조군에서 연속적인 생검의 영향을 비교한 결과 TGF- β 1 mRNA는 각 시기에 따라 큰 차이가 없었는데 제 I형 collagen의 mRNA는 제 15일에 경미한 증가를 보였는데 이는 연속 생검을 시행하면서 부분적인 치유과정에서 유발된 것으로 해석하였다. 그러나 신 섬유화를 예측하는 데는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각되며, 이런 연속적인 생검으로 신조직을 얻은 후 total RNA를 분리하는 것이 본 연구 결과로 미루어 한 동물의 생체 내에서의 동적인 변화를 잘 반영할 것으로 생각된다. 간질성 교원질 중 제 I형 Collagen과 제 III형 collagen에 대한 연구가 주로 되어있다. Lee 등³²은 간질성 상흔의 지표로서 α 1(I) collagen과 α 2(I) collagen을 측정하여 상대적 유용성을 비교한 결과 α 1(I) collagen mRNA의 측정이 더 예민하고 재연성이 높다고 하였다. 본 연구에서도 동일하여 α 1(I) collagen mRNA에 대한 결과를 활용하였다. Lee 등³²의 결과와 비슷하게 저자들은 생검한 조직의 부위에 따른 차이가 있는지를 알아보기 위해 신 수질과 피질을 나누어서 연구하였는데, 정상 대조군과 질병을 유발한 후 제 1일에는 collagen I mRNA가 별 차이가 없었다. 실험군에서 α 1(I) collagen mRNA는 신 피질과 수질에서 유사하여 제 1일에는 대조군과 비슷하였고 제 4일부터 약하게 증가되기 시작하여 점차 증가되어 제 15일에는 현저히 증가된 발현을 보여주었다. 이는 현미경적으로 신 섬유화가 분명하게 나타나는 시기에 지속되는 것으로 미루어 후기의 진행된 신 섬유화도 계속 활동적인 과정으로 해석된다. Striker¹⁰도 진행성 신 경화증의 모델에서 심한 사구체 경화를 보인 2예가 가장 높은 α 1(IV) collagen mRNA를 보인 것은 신 섬유화 후기에 계속적으로 진행되는 것을 활동적인 과정으로 설명하였다.

진행되는 신장의 상흔으로 교원질 축적이 증가되는 것은 여러 신 질환에서 발생하는 만성 신부전의 공통적인 결과이다. 사구체경화증이나 세뇨관간질 섬유화에서 세포성 단백질량과 ECM성분의 합성과 분해 사이의 평형이 깨어지게 된다. Downer 등¹⁴은 토끼의 항 사구체 기저막 항체로 유발한 반월성 신염에서 ECM을 구성하는 단백질을 생화학적으로 측정하여 신 조직에서 collagen의 양이 제 14일에 증가됨을 알 수 있었고, 그 후 여러 연구에서도 여러 가지 방법으로 단백질 합성의 증가 (up-regulation)와 혹은 단백질 분해 효소의 저하 (down-regulation)가 세포의 비후와 ECM 확장의 원인으로 설명하였고 이때 이렇게 단백질 분해 효소의 감소는 TGF- β 의 변화에 의해서 매개된다고 생각한다. 그러므로 단백질 분해의 장애가 신 섬유화에 중요하며, 동물실험으로 이를 투여하여 좋은 효과를 보여주어 치료전략으로 사용할 수 있음을 시사하였다.³³

신 섬유화의 진행과정에서 중요한 기질 단백질 중 간질성 교원질의 대표적인 Type I collagen의 변화를 조절하는 것으로 알려진 TGF- β 1이 중요하다. TGF- β 1의 mRNA를 신 조직의 피질과 수질을 분리하여 비교한 결과 양적인 차이가 보였지만 증가되는 추세는 비슷하였고 실험군에서는 발병 후 제 1일에서부터 발현되기 시작하여 증가되는 소견을 알 수 있었다. 연속 생검에서 신 수질과 신 피질의 조직을 분리한 후 전체 RNA를 분리하여 비교하였을 때 특히 신 수질에서 더 뚜렷하였으나 전반적으로 양측이 비슷한 소견을 보여주었다. 이 방법은 Competitive RT-PCR로 시행한 결과보다는 다소 정확도가 떨어지지만, 본 연구에서는 한 동물에서 반정량적인 RT-PCR을 이용하여 α 1(I) collagen mRNA의 변화를 알아보았고, 동시에 제 1형 collagen 합성을 조절하는 유전인자로 잘 알려진 TGF- β 1 mRNA 발현을 같이 시행하여 상호간의 연관성을 비교하였다. 본 연구에서 TGF- β 1 mRNA의 증가가 수질과 피질에서 다소 차이가 있어서 피질은 제 7일에 가장 높은 반면 수질은 제 4일이 제 7일보다 높게 나타났다. 이런 차이에 대한 정확한 이유는 설명하기 어렵다. 그러나 TGF- β 1 mRNA가 α 1(I) collagen mRNA보다 앞서 증가하는 점은 TGF- β 1이 신 섬유화에 관여하는 인자들을 초기에 조정하며 특히 간질성 교원질의 성분 중 가장 대표적인 α 1(I) collagen mRNA의 발현을 조절한다는 설을 뒷받침하는 소견으로 생각된다.

사구체경화를 유발하는 동물모델에서 사구체의 ECM 성분의 변화를 연구하는데는 전체 신 조직을 이용하는 것 보다 신 조직을 저온으로 유지하여 현미경하에서 사구체만을 분리 (microdissection)한 후 시행하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있다고 한다.¹⁰ 그러나 본 연구에서는 사구체 기저막 성분이 아닌 ECM 중 간질성 교원질에 대한 변화를 알아보았다. 그러므로 본 연구 결과에서 확인되는 것과 같이 반월 형성을 보이는 비율은 병의 진행에 따라 감소하는 경우도 있고 또한 신 섬유화의 시작이 간질에서 시작되고 또 간질의 섬유화의 정도가 신 기능의 예후에 더욱 중요하다는 보고가 있으므로 사구체만 분리하여 연구하는 방법은 부적절한 결과를 가져올 수도 있는 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 사구체를 따로 분리하여 연구하지는 않았으므로 어느 쪽이 우세하게 제 1형 collagen mRNA와 TGF- β 1 mRNA치의 변화에 영향을 주었다고는 말할 수 없다.

사구체내에서 발현하는 유전자의 mRNA치를 검사하기 위해서는 전통적으로 RNA를 추출하여 Northern blot을 시행하는데 실제 동물실험에서도 수 천개의 사구체를 분리하여야하므로 실용성이 적다. 그러므로 최근에 PCR의 방법을 활용하게되었고 competitive RT-PCR을 이용하여 정상 사구체와 사구체경화를 보이는 생쥐를 비교하였다.¹² 이런 방법으로 여러 가지 기저막 성분의 유전자 발현의 증가를 확인하였고, 성장 홀몬으로 유전자를 이식한 후 병이 빨리 진행되는 군에서는 미만성

사구체경화를 유발하게되고 α 1(IV) collagen, laminin B1, tenascin 및 TGF- β 1의 mRNA치가 현저히 증가하였다.^{13,34}

당뇨병성 신병증³⁵을 위시하여 여러 사구체질환에서 진행된 사구체경화증이나 진행성 신 섬유화를 유발하는 실험적 모델에서 사구체내에 간질성 교원질의 출현을 증명하였다.^{17,18,26,32} 본 연구에서는 비교적 쉽게 임상적으로 활용할 수 있고 간편한 방법으로 생검 조직으로 전체 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 시행하여 GAPDH의 발현을 비교하였다. 그 후 전체 RNA의 양을 일정하게 조정하여 다시 PCR을 시행하면 발현의 정도를 반정량적으로 비교할 수 있어 Northern blot으로 시행할 때 보다 소량의 조직으로도 가능하며 좋은 결과를 기대할 수 있었다. Lee등³²은 염증의 정도에 따라 그리고 부위에 따라 질병의 정도가 다를 수 있으므로 적당한 량의 조직을 얻어서 collagen I : GAPDH의 비율을 얻기 위해서는 최소한 2 mg 정도의 조직에서 시행하는 것이 좋다고 하였다. 항 사구체 질병의 유도는 투여한 항체의 량에 따라 그리고 유도된 염증의 심한 정도에 따라 collagen I mRNA의 치가 변화됨을 시사하였고 본 연구에서도 이를 확인하였다. 그러나 동일한 량의 항체를 사용하여도 유도되는 질병의 정도가 차이를 보이는 것은 개체에 따른 차이로 생각되며 진행되는 군과 비 진행성 군이 유전적인 차이에 의한 것으로 설명하기도 한다.^{10,34}

결 론

토끼의 항 사구체기저막 질환의 연속생검에서 시행한 반정량적인 RT-PCR의 방법을 이용한 TGF- β 1 mRNA와 ECM의 간질성 교원질인 Collagen I의 축적을 알아보는 방법으로 시행한 collagen I mRNA의 시기별 변화를 연구한 결과 TGF- β 1 mRNA는 collagen I mRNA보다 앞서서 발현되기 시작함을 알 수 있었고, 신기능에 대한 임상적 검사 및 병리조직학적 변화와 함께 collagen I mRNA의 증가된 발현이 보이면 진행되는 신 섬유화를 예측하는 중요한 도구로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Struts F, Muller GA. On the progression of chronic renal disease. *Nephron* 1995; 69: 371-9.
2. Bohle A, Christ H, Grunde KE, Mackenson S. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979; 16: 109-14.
3. Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesion. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1273-87.
4. United State Renal Data System: USRDS 1996 Annual Data Report. National Institutes of Health, NIDDK, Bethesda, 1996.
5. Waker M, Drew H, La France N. Creatinine measure-

- ments often yield false estimates of progression in chronic renal failure. *Kidney Int* 1988; 34: 412-8.
6. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, et al. Prognostic factors in lupus nephritis: Contribution of renal histologic data. *Am J Med* 1983; 75: 382-91.
 7. Schwartz MM, Bernstein J, Hill GS, Holly K, Phillips EA. The lupus nephritis collaborative study group. The predictive value of renal pathology in diffuse proliferative lupus glomerulonephritis. *Kidney Int* 1989; 36: 891-6.
 8. Park MH, D'Agati VD, Appel GB, Pirani CL. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: Relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron* 1986; 44: 309-19.
 9. Radford MG, Donadio JV, Bergstralh EJ, Grande JP. Predicting renal outcome in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 199-207.
 10. Striker L. Modern renal biopsy interpretation: Can we predict glomerulosclerosis. *Sem Nephrol* 1993; 13: 508-15.
 11. Moriyama T, Murphy HR, Martin BM, Garcia-Perez A. Detection of specific mRNAs in single nephron segments by use of the polymerase chain reaction. *Am J Physiol* 1990; 258: F1470-4.
 12. Peten EP, Striker LJ, Carome MA, Elliot SJ, Yang CW, Striker GE. The contribution of increased collagen synthesis to human glomerulosclerosis: A quantitative analysis of $\alpha 2$ IV collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1992; 176: 1571-6.
 13. Doi T, Striker LJ, Kimata K, Peten EP, Yamada Y, Striker GE. Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney mRNA levels. *J Exp Med* 1991; 173: 1287-90.
 14. Downer G, Phan SH, Wiggins RC. Analysis of renal fibrosis in a rabbit model of crescentic nephritis. *J Clin Invest* 1988; 82: 998-1006.
 15. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC. Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 233-40.
 16. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993; 269: 1829-35.
 17. Merritt SE, Killen PD, Phan SH, Wiggins RC. Analysis of $\alpha 1(I)$ procollagen, $\alpha 1(IV)$ collagen, and β -actin mRNA in glomerulus and cortex of rabbit with experimental anti-GBM disease: Evidence for early extraglomerular collagen biosynthesis. *Lab Invest* 1990; 63: 762-8.
 18. Wiggins R, Goyal M, Merritt S, Killen PD. Vascular adventitial cell expression of collagen messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody-induced crescentic nephritis in the rabbit, a cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Lab Invest* 1993; 68: 557-65.
 19. Jones CL, Buch S, Post M, MaCulloch L, Liu E, Eddy AA. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 1992; 141: 1381-96.
 20. Sporn MB, Roberts AB. Transforming Growth factor- β : Recent progress and new challenge. *J Cell Biol* 1992; 119: 1017-21.
 21. Coimbra T, Wiggins R, Noh JW, Merritt S, Phan SH. Transformation growth factor- β production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am J Pathol* 1991; 138: 223-34.
 22. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- $\beta 1$ development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45: 916-27.
 23. Abboud HE. Growth factors in glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993; 43: 252-67.
 24. Border WA, Noble NA. TGF- β in kidney fibrosis: A target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1388-96.
 25. 안혜선, 노정우, 박문향. 가토의 항 사구체기저막 항체에 의한 사구체 신염에서 반월 형성의 연속적 변화에 관한 연구. *대한병리학회지* 1997; 31: 219-32.
 26. Ebihara I, Suzuki S, Nakamura T, et al. Extracellular matrix component mRNA expression in glomeruli in experimental focal glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1387-97.
 27. Munaut C, Bergijk, EC, Baelde JJ, et al. A molecular biologic study of extracellular matrix components during the development of glomerulosclerosis in murine chronic graft-versus-host disease. *Lab Invest* 1992; 67: 580-7.
 28. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DER, Brown DM, Goetz FC. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1984; 74: 1143-55.
 29. Fogo A, Hawkin EP, Berry PL, et al. Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1990; 38: 115-23.
 30. Rodman HP, Muller GA. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease. II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 684-6.
 31. Striker GE, Striker LJ. Glomerular cells in culture. *Lab Invest* 1985; 53: 122-30.
 32. Lee S-K, Goyal M, de Miguel M, et al. Renal biopsy collagen I mRNA predicts scarring in rabbit anti-GBM

- disease: Comparison with conventional measures. *Kidney Int* 1997; 52: 1000-15.
33. Heidland A, Sebekova K, Paczek L, et al. Renal fibrosis: Role of impaired proteolysis and potential therapeutic strategies. *Kidney Int* 1997; (Suppl) 62: S-32-5.
34. Yang CW, Striker GE, Chen WY, Kopchick J, Striker LJ. Differential expression of glomerular extracellular matrix and growth factor mRNA in rapid and slowly progressive glomerulosclerosis: Studies in mice transgenic for native or mutated growth hormone. *Lab Invest* 1997; 76: 467-76.
35. 백승삼, 박문향. 당뇨병성 신병증에서 세포외 기질성분의 분포에 관한 연구. *대한병리학회지* 1997; 31: 427-35.
-