

## 만성 속발성 신질환 모델동물에서 콜라젠 변화의 지표

남정석 · 김기영\* · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학실, 원광대학교 의과대학 병리학교실\*

### Markers of Collagen Change in Chronic Secondary Renal Disease Model in Rat

Jeong-Seok Nam, Ki-Young Kim\*, Yong-Soon Lee

Laboratory of Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University and  
Medical School Pathology, Wonkang University\*

(Received September 20, 1996)

(Accepted October 2, 1996)

**ABSTRACT :** In order to develop a suitable secondary renal disease model and diagnostic markers of renal disease in the rat, the change of PIII (aminoterminal procollagen III peptide) in serum and hydroxyproline levels in the renal tissue that reflect the synthesis of extracellular matrix (ECM) during development of experimental renal diseases were observed. Two types of experimental primary diseases, diabetes mellitus administrated by streptozotocin (STZ, 75 mg/kg, i.p.) and liver cirrhosis produced by bile duct ligation/scission (BDL/s) operation, were induced. The hydroxyproline level increased according to the high PIII and NC1(carboxyterminal procollagen IV peptide) in Western blot analysis as early as 1 week in the STZ treated-rat kidney. Increased renal ECM was observed at 15 weeks in STZ and BDL/s model under the microscopic examination. High PAS positive reaction was found in capillary basement membrane in STZ treated-rats and mesangium in BDL/s operated rats at this time, showing the histological characteristics of diabetic nephropathy and cirrhotic glomerulonephritis in human, respectively. Such secondary renal failure were supported by additional tests including urinalysis and renal function test. The serum PIII detected by ELISA was a useful parameter to estimate synthesis rate of renal ECM during development of renal disease without extrarenal fibrosis i.e. liver cirrhosis in rats. This study is proposed that STZ treatment or BDL/s operation may be a suitable experimental animal model for the induction and development of chronic secondary renal diseases. Moreover, it was found that hydroxyproline level in renal tissues was a good parameter of the change of renal ECM at the early stage of the diseases without apparent histological changes. Especially, serum PIII could be a choice as a diagnostic or prognostic marker during the development of renal diseases in rats.

**Key Words :** PIII (aminoterminal procollagen III peptide), NC1 (carboxyterminal procollagen IV peptide), Hydroxyproline, Streptozotocin, Bile duct ligation/scission, Sprague-Dawley rat, Chronic secondary renal disease

### I. 서 론

신장에 장애가 초래되어 나타난 신질환에는 그 원인과 기전이 다양하나, 일반적으로 세포외 기질(extracellular matrix)의 증가를 초래하며, 이의 중요성에 대한 연구와 관심이 날로 고조되고 있다.

세포외 기질은 신장에서 사구체의 mesangium, 기저막 그리고 간질조직 등을 구성하며, proteoglycan, fibronectin, laminin, collagen 등으로 이루어져 있다(Keller 등, 1988). 이 중에서 collagen은 생체내 총 단백

질의 약 1/3을 차지하는 주요 단백질이고, 신피질 건조중량의 약 2%를 차지하는데 신장의 위치에 따라 collagen type이 다소 다른 바 큰 혈관이나, 캡슐, 신우등은 type I, 보우만낭의 외벽층이나 간질에는 type III, 세뇨관 기저막에는 type IV, 사구체 기저막은 type IV & V으로 구성되어 있으며, 간질형인 type I & III collagen도 만성 신염(chronic nephritis)이나 당뇨병성 사구체 경화증(diabetic glomerulosclerosis) 및 세포배양에서는 메산지움(mesangium)에서 관찰된다고 한다(임, 1990).

Collagen metabolism의 합성과 분해 산물인 am-

inoteriminal procollagen peptide, carboxyterminal procollagen peptide, 7S collagen 등은 혈중을 비롯한 생체 내의 분비물에도 나타날 수 있다(Schuppan, 1990). 그러므로 이 collagen의 대사산물과 분해산물을 혈중이나 뇨 등의 생체내 분비물에서 측정·정량할 수 있는 것이다. 예를 들어, 신장의 경우에서 "glomerular & tubular basement membrane"의 주요성분인 Type IV collagen과 interstitium과 glomerular mesangium의 주요성분인 type III collagen의 synthesis와 degradation 양상을 나타내는 혈청과 뇨중의 PIII(aminoterminal procollagen III peptide)와 NC1(carboxyterminal procollagen IV peptide)을 측정하는 것은 신장질환을 평가하는 유용한 지표라고 보고되었다(Hahn 과 Schuppan, 1983 ; Sterzel 등, 1986 ; Karttunen 등, 1986 ; Wingen 등, 1987).

본 연구에서는 Sprague-Dawley 랫드에 일정한 양의 streptozotocin(75 mg/kg, i.p.)을 투여하여 당뇨병을 유발하고(STZ군), 또한 담도 결찰 수술을 실시하여 간경변을 유발하여(BDL/s군) 만성 속발성으로 오는 신질환에서 renal fibrosis를 확인하기 위하여 혈청내 PIII의 함량을 ELISA방법으로 정량하였고, 신장조직내의 hydroxyproline함량을 측정하였으며 또한 신장조직내에서 PIII와 NC1 단백질 생산의 발현정도를 알아보기 위하여 western blot analysis를 실시하였고, 혈액화학적 방법으로 serum creatinine을 측정하고 또한 일반적인 뇨검사를 실시하여 신기능 검사를 실시하였다. 또한 신장조직을 일반적인 조직처리 과정을 거쳐서 조직표본을 제작한 다음, PAS염색을 실시하여 비교 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

서울대학교 실험동물 사육장에서 4주령의 Sprague-Dawley(S.D.) 암컷 랫드 100마리를 분양받아 실험실 환경적응을 위해서 예비사육한 후 13주령에 실험을 시작하였다.

### 2. 실험설계

13주령된 랫드는 streptozotocin 투여군(STZ군)에 40마리, bile duct ligation/scission operation군(BDL/s군)에 42마리, 대조군에 16마리를 배치하였다. 각군에서 1, 6, 15주에 부검하였고, STZ군에서는 citrate buffer (pH 4.5)에 용해한 streptozotocin(Sigma, USA)을 체중 kg당 75 mg씩 복강내로 투여하였다. BDL/s군에서는

마취한후 담도 결찰 수술을 실시하였다. 대조군은 아무런 처치를 하지 않았다.

### 3. 실험재료의 채취

부검직전에 동물의 체중을 측정하고, 에테르로 마취한 후, 복대정맥에서 혈액을 채취하였고, 신장을 적출, 무게를 측정하여 체중에 대한 신장의 무게비율을 계산하였다. 신장의 일부는 hydroxyproline측정과 Western blot analysis를 위해 질소탱크에서 급속 냉동한 후, -70°C에 보관하였다. 나머지는 Hematoxylin 및 eosin(H & E)염색, 특수염색(PAS staining)을 하기위하여 10%중성 포르말린액에 고정하였다.

### 4. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

혈청의 PIII의 정량은 Schuppan 등(1986)의 radioimmunoassay 방법을 응용한 ELISA법을 이용하였다. PIII항원의 농도는 여러 농도중에서 적정항원 농도로 200 ng/200  $\mu$ l가 더 좋은 결과를 나타내어 이를 계속 inhibition assay에 사용하였고, PIII항체의 적정희석배율은 최고 결합치 100%의 50%인 1:1000으로 하였다. 그리고, 혈청내 PIII농도를 측정하기 위하여 혈청시료를 1:50부터, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600으로 계단희석하여 PIII항체와 16시간 반응시킨 다음 200  $\mu$ l씩 분주하여 1시간동안 incubation하였다. 혈청 PIII에 대한 정량을 하기 위하여 표준곡선을 작성하였는데, 10  $\mu$ g/200  $\mu$ l를 최고 농도로 하고, 5, 2.5, 1.25  $\mu$ g/200  $\mu$ l, 62.5, 312.5, 156.3, 78.1, 39, 19.5, 9.8, 4.9, 2.4 ng/200  $\mu$ l의 14단계로 계단희석한 결과 standard의 50% 절편을 읽어 0.135 ng/ml을 기준으로 삼았다.

### 5. 신장조직내 hydroxyproline의 함량 측정

신장내 hydroxyproline치의 측정은 Rojkind 등(1979)의 방법에 따라서, 부검시 신장의 일부를 떼어 -70°C에 보관 후, 0.2 g의 신장조직을 6N-HCl 2 ml을 넣어 마쇄하고 표준검체로는 trans-4-hydroxyproline을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu$ g/50 ml로 농도를 희석시켜, 110°C에서 12시간 가열, 여과하여 50  $\mu$ l 시료를 취하고 chloramine-T로 산화시켜 p-dimethylaminobenzaldehyde(Sigma, USA)를 chromogen으로 사용하여 발색시켜 558 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

### 6. Western blot analysis

신장조직내의 PIIP와 NC1에 대한 Western blotting은 Schuppan 등(1986)의 방법에 따라서, 0.2 g의 신장조직을 2 ml의 염산(0.5N HCl)에 혼합하여, homogenization을 시켜서 원심분리(720 rpm, 10분)한 후, 상층액을 dialysis tube에 넣고 gel electrode buffer에서 산을 제거한 후 western blotting의 시료로 사용하였다. sample 20 µg과 M.W. standard 10 µl에 대해 전기영동을 실시한 후 즉시 Western blotting을 실시하였다. Gel의 transfer가 끝난후 3% non-fat-milk에 membrane을 담그어 1시간동안 blocking을 하였다. 그 후 PBS로 washing하여 non-fat-milk를 제거한 후, 1st antibody(PIIP or NC1 antiserum, 원광대학교 의과대학)를 가하여 3시간 이상 rocking시켰다. 다시 PBS로 washing한 후 2nd antibody(goat-antirabbit IgG, Dako)를 가하여 2시간 정도 rocking시킨후 washing 하였다. 그후, NBT(nitrobluetetrazoline)/BCIP(bromochroloindoliphosphate ; Sigma, USA)를 이용하여 발색시켰다.

### 7. 혈액화학적 신기능 검사

부검시에 동물을 ether로 마취시켜 복대정맥에서 채혈하였다. 10 ml 시험관에 채혈한 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(3000 rpm, 30분)하여 분리한 혈청을 대상으로 검사하였다. Creatinine의 농도는 자동분석기(autoanalyzer, RA-XT, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 8. 체중, 음수, 사료 및 혈당, 뇨 검사

실험 시작전과 부검 직전에 체중, 음수, 사료소비량을 측정하고 N-Multistix(AMES Co., USA)을 사용하여 뇨를 검사하였고, Glucometer(LIFESCAN Co., USA)를 사용하여 혈당을 측정하였다.

### 9. 병리학적 관찰

신장의 일부를 절취하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정된 다음 파라핀 블록을 만든 후 3 µm두께의 조직 절편을 만들어 H&E(hematoxilin and eosin), PAS(periodic acid schiff) 염색을 한 다음 광학현미경으로 병변을 관찰하였다.

### 10. 자료의 통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처

리 computer program인 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 등분산 검정후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 비교 분석하여 유의수준  $p < 0.05$ 로 Duncan's multiple range test를 하였다.

## III. 결 과

### 1. 임상증상

BDL/s군에서는 수술 4주후부터 약한 황달 증상이 나타나기 시작하였으며, 6주부터는 눈, 귀, 발등의 말단부분에서 황달증상이 나타났고, 또한 복수로 인하여 복부가 팽만한 것이 관찰되었다. STZ군은 다음, 당뇨의 증상을 보였다.

### 2. 체중 변화

1주 부검군에서는 대조군에 비해 BDL/s군, STZ군이 체중이 줄었고, BDL/s군보다 STZ군이 더욱 감소 하였다. 6주 부검군에서는 대조군에 비해 STZ군이 체중이 줄었으나, 1주 부검군 보다는 증가하였다. 그러나 BDL/s의 6주 부검군은 거의 대조군만큼 증가하였으나, 외관상 관찰과 부검시에 상당한 양의 복수의 증가가 관찰되었다. 마지막으로 15주 부검군에서는 대조군에 비해 BDL/s군과 STZ군이 감소 하였으나 유의성은 나타내지 않았고, STZ군과 BDL/s군은 체중이 회복되어 가고 있어 만성으로 진행됨을 나타냈다.

### 3. 혈당의 변화

Control군에 비하여 모든 부검군의 BDL/s군은 혈당

**Table 1.** Change of blood glucose in rats given streptozotocin and rats operated bile duct ligation/scission. (unit :mg/dl)

	Control	BDL/s*	STZ**
0 week	67.71 ± 6.21 <sup>a</sup> (16/16) <sup>b</sup>	63.89 ± 11.04 (42/42)	64.00 ± 5.80 (40/40)
1 week	65.43 ± 9.45 (6/6)	62.00 ± 8.31 (9/14)	361.78 ± 41.24 <sup>c</sup> (7/12)
6 week	69.00 ± 8.02 (6/6)	69.00 ± 15.72 (4/14)	468.00 ± 77.42 <sup>c</sup> (4/12)
15 week	65.25 ± 6.13 (4/4)	62.50 ± 0.71 (2/14)	491.40 ± 52.20 <sup>c</sup> (6/16)

<sup>a</sup> Values express the mean ± SD(n=2~42) ; <sup>b</sup> survived rats/total rats ; <sup>c</sup> Significantly different from control group( $p < 0.05$ ) ; \* rats operated bile duct ligation/scission operation ; \*\* rats given streptozotocin(75 mg/kg, i.p.).

**Table 2.** Hydroxyproline values in the kidney and kidney/body weight ratio of rats given streptozotocin and rats operated bile duct ligation/scission.

	g/kidney weight			kidney/B.W.		
	Ctl*	BDL/s**	STZ***	Ctl*	BDL/s**	STZ***
1 week	4219.11±190.50 <sup>a</sup> (6/6) <sup>b</sup>	3194.85±101.47 (9/14)	4434.54±539.46 (7/12)	0.0082±0.0002 (6/6)	0.0078±0.0005 (9/14)	0.0099±0.0005 (7/12)
6 week	4285.92±645.42 (6/6)	5657.72±1219.06 (4/14)	5796.45±1013.14 (4/12)	0.0072±0.0006 (6/6)	0.0096±0.0006 <sup>c</sup> (4/14)	0.0116±0.0014 <sup>c</sup> (4/12)
15 week	4229.47±94.05 (4/4)	10724.89±3300.20 <sup>c</sup> (2/14)	7385.29±831.53 <sup>c</sup> (6/16)	0.0060±0.0003 (4/4)	0.0180±0.0001 <sup>c</sup> (2/14)	0.0126±0.0014 <sup>c</sup> (6/16)

a Values express the mean±SD(n=2~42); <sup>b</sup> survived rats/total rats; <sup>c</sup> Significantly different from control group(p<0.05); \* control; \*\* rats operated bile duct ligation/scission operation; \*\*\* rats given streptozotocin(75 mg/kg, i.p.).

의 변화는 거의 관찰할 수 없었다. 그러나, STZ군은 대조군에 비하여 1, 6, 15주의 모든 부검군에서 혈당이 증가함을 나타내었다(p<0.05)(Table 1).

#### 4. 신장 조직내의 hydroxyproline의 함량 및 신장에 대한 신장무게의 비율

신장조직에 대한 hydroxyproline의 양을 살펴보면, 6주 부검시에서 대조군에 비하여 BDL/s군에서 약 32%증가하였고 STZ군에서는 약 35% 증가함을 보이고, 15주 부검시에서는 대조군에 비해서 BDL/s군은 약 154%증가하였고, STZ군은 약 75%증가함을 보여 BDL/s군과STZ군이 대조군에 비하여 공히 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05).

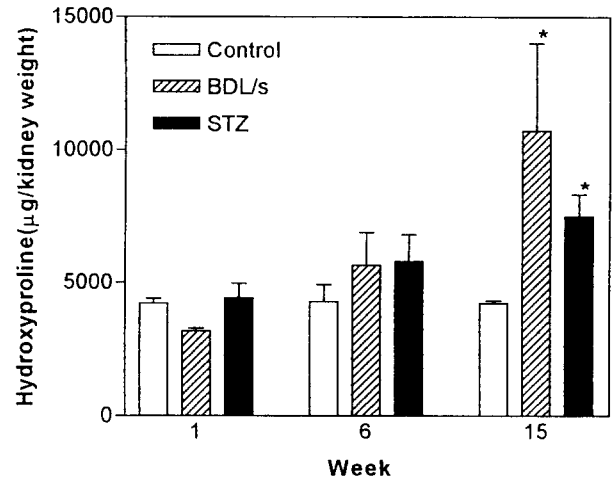
체중에 대한 신장의 무게 비율에 관해서 살펴보면, 1주 부검시에서 대조군에 비하여 STZ군이 유의성 있는 증가를 보였고(p<0.05), 6, 15주 부검시에서는 대조군에 비하여 BDL/s군과 STZ군이 공히 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05)(Table 2, Text-fig. 1).

#### 5. 뇨 검사

뇨당은 STZ군에서 streptozotocin투여 후 급격한 증가를 보여 1, 6, 15주의 모든 부검군에서 100% 2 g/dl의 소견을 보였다. 그러나 BDL/s군은 음성 소견을 보였다.

Bilirubin은 BDL/s군에서 담도 결찰 수술을 한 후 급격한 증가를 보여 1, 6, 15주의 모든 부검군에서 100% 심한 bilirubin치의 소견을 보였다. 그러나 STZ군은 음성 소견을 보였다.

케톤체(ketone body)는 BDL/s군에서 1, 6주는 음성 소견을 보였으나, 15주때 100% 15 mg/dl의 소견을 보였다. 그러나 STZ군에서는 1주때, 25%가 80 mg/dl의 소견을 보였고, 6주때는 33%가 160 mg/dl의 소견을 보

**Text-Fig 1.** Hydroxyproline values in the kidney of rats given streptozotocin and rats operated bile duct ligation/scission.

\*, Significantly different from control group(p<0.05); BDL/s, rats operated bile duct ligation/scission operation; STZ, rats given streptozotocin(75 mg/kg, i.p.); Vertical bars express the standard deviation(n=2~42).

였으며, 15주때는 100% 40 mg/dl의 소견을 보였다.

뇨단백은 STZ군에서 6주때는 100%가 의양성의 소견을 보였고, 15주때는 33%가 30 mg/dl의 미세한 단백뇨 소견을 보였다. BDL/s군에서는 6주때 100%가 30 mg/dl의 미세한 단백뇨 소견을 보였고, 15주때는 100%가 1000 mg/dl의 높은 단백뇨 소견을 보였다.

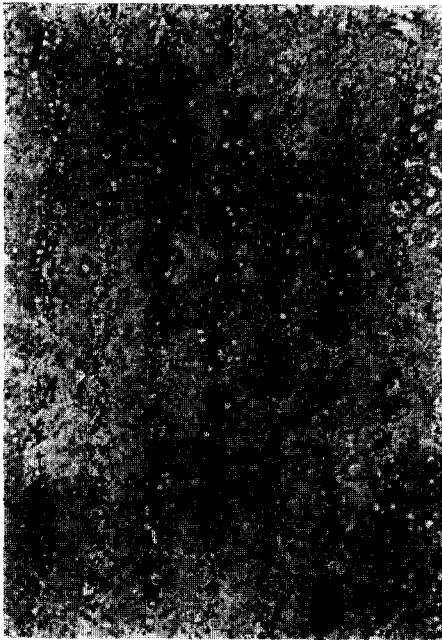
#### 6. 혈액화학적 신기능 검사 소견

사구체여과율(GFR; glomerular filtration rate)의 지표인 creatinine의 측정결과는 1주 부검군에서 대조군보다 BDL/s군은 57%증가를 보이고 STZ군에서 90%의 유의성 있는 증가(p<0.05)를 보였다. 6주 부검군에서는 STZ군이 대조군보다 54%의 유의성 있는 증가(p<0.05)를 보였다. 15주의 부검군에서는 STZ군이 대조군보다 18%의 증가를 보였다(Table 3).

**Table 3.** Serum Creatinine in rats given streptozotocin and rats operated bile duct ligation/scission. (unit :mM/L)

	Control	BDL/s*	STZ**
1 week	0.40±0.21 <sup>a</sup> (6/6) <sup>b</sup>	0.63±0.16 (9/14)	0.76±0.21 <sup>c</sup> (7/12)
6 week	0.68±0.08 (4/6)	0.70±0.13 (4/14)	1.05±0.07 <sup>c</sup> (4/12)
15 week	0.85±0.07 (2/4)	- (2/14)	1.00±0.17 (6/16)

<sup>a</sup> Values express the mean±SD(n=2~42); <sup>b</sup> survived rats/total rats; <sup>c</sup> Significantly different from control group(p<0.05); \* rats operated bile duct ligation/scission operation; \*\* rats given streptozotocin(75 mg/kg, i.p.); - loss of sample.



**Fig. 1.** Severe cholangiofibrosis were seen in the 15 week old BDL/s operated rat in the liver. H&E. x100.

## 7. 병리학적 관찰

BDL/s군에서는 6주의 간에서는 표면이 울퉁불퉁하고 경도가 증가함을 보였다. 그리고 병리조직학적 관찰시에 결합조직의 증식과 위담관(pseudobile duct)의 증식을 동반한 fibrosis가 나타나기 시작했다. 그리고 15주에는 완전한 cholangiofibrosis의 소견이 관찰되었다(figs. 1 and 2).

BDL/s군 신장의 6주의 육안적 소견은 갈색 색소 침착의 소견을 보였고, 15주의 신장의 조직학적 소견은 갈색과립의 색소가 세뇨관 세포질에 침착되어 나타났고, 세뇨관 상피세포의 공포변성, 괴사 등의 병리조직학적 병변이 나타났으며, 간질결합조직의 lymphocyte 반응과 glomerular tuft의 변성이 나타나며, 사구체 모

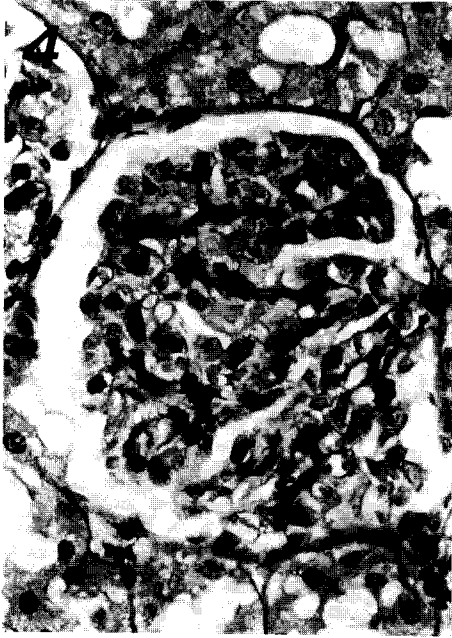


**Fig. 2.** High magnification of fig 1. showed pseudobile duct hyperplasia(large arrowhead) and fibrosis(small arrowhead). H&E. x200.



**Fig. 3.** The pancreatic islets showed irregular spherical forms, endocrine broken into by exocrine and showed lymphocytes infiltration (large arrowhead) and solitary degeneration(small arrowhead) in 15 week old STZ treated rat. H&E. x200.

세혈관용적(glomerular tuft volume)이 증가하고, 대조군(control group)과 비교하여 mesangium 내부의 PAS positive 증가함을 나타내었다(figs. 4 and 5).



**Fig. 4.** The glomerulus tufts were seen normal in 15 week old control rat. PAS. x400.



**Fig. 5.** The glomerular tuft in 15 week old BDL/s operated rats showed glomerular tuft increase and high PAS positive in mesangium. PAS. x400.

STZ군에서는 15주째의 육안적 소견은 망막 혼탁을 보였고, 신장의 크기는 대조군보다 비대함을 보였다. 조직학적으로는 15주에서 pancreas는 exocrine이 en-



**Fig. 6.** The glomerular tuft in 15 week old STZ treated rats showed PAS positive on glomerular capillary basement membrane. PAS. x400.

dochrine쪽으로 침범하여 원형 또는 타원형의 endocrine의 고유구조가 깨지고 endocrine에서는 림파구의 침윤과 호재성의 변성등이 관찰되었다. 신장의 조직학적 소견은 15주의 STZ의 랫드의 신장에서 사구체 내의 혈관벽의 PAS positive의 증가를 보였고, 또한 glomerular basement membrane(GBM ; 보우만 캡슐)도 PAS positive의 소견을 보였다(figs. 3 and 6).

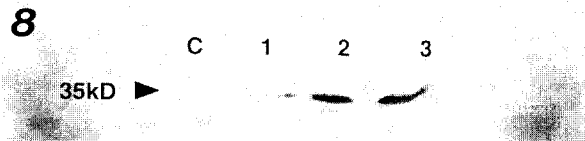
## 8. Western blot analysis

실험개시후 1, 6, 15주에 부검시에, 각 군의 신장조직을 reduced SDS-PAGE를 실시한 후 immunoblotting 하여 PIIP와 NC1의 발현 양상을 관찰하였다.

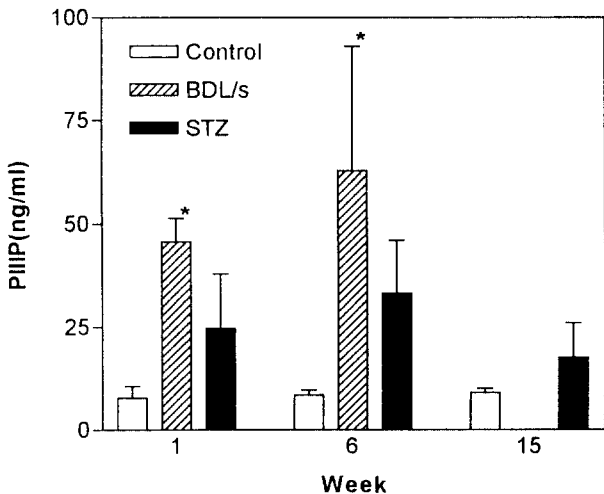
Streptozotocin을 투여한 STZ군에서 NC1를 살펴보면, 대조군에서는 감지되지 않았지만, 35kD에서 band가 형성되어 1, 6, 15주에서는 시간이 경과함에 따라 단백질의 발현이 증가됨을 나타내어 streptozotocin이 NC1합성을 직·간접적으로 증가시켰음을 추측할 수 있다(Fig. 7). PIIP에 관해서 살펴보면, Fig. 8에서 보는 바와 같이 STZ군에서는 PIIP의 발현이 시간의존적인 경향이 나타났으나, 이에 반하여 BDL/s군은 1, 6, 15주의 시간의 경과에 따라 PIIP, NC1의 band가 뚜렷하지 않았다(figs. 8).



**Fig. 7.** Western blot analysis of NCI(carboxyterminal procollagen IV peptide) in renal tissue of STZ treated rat. c lane, control ; 1, 2 lane, 1week ; 3 lane, 6week ; 4, 5 lane, 15week.



**Fig. 8.** Western blot analysis of PIIP(aminoterminal procollagen III peptide) in renal tissue of STZ treated rat. c lane, control; 1 lane, 1week ; 2 lane, 6week ; 3 lane, 15week.



**Text-Fig 2.** Serum PIIP(aminoterminal procollagen III peptide) values in rats given streptozotocin and rats operated bile duct ligation/scission.

\*, Significantly different from control group( $p < 0.05$ ) ; BDL/s, rats operated bile duct ligation/scission operation ; STZ, rats given streptozotocin(75 mg/kg, i.p.) ; Because of loss of BDL/s serum sample at 15week, serum PIIP couldn't be estimated ; Vertical bars express the standard deviation( $n = 2 \sim 42$ ).

**9. ELISA**

혈청 PIIP치는 부검시 복대정맥에서 채혈한 혈액을 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리하여 분리한 혈청을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1, 6주 부검군에서 대조군보다 BDL/s군은 각각 약 594%, 752%의 유의성 있는 증가( $p < 0.05$ )를 보였다( $p < 0.05$ ). 반면에 STZ군은 1, 6, 15주 부검군에서 대조군보다 각각

321%, 396%, 210%의 증가를 보였다(Text-fig. 2).

**IV. 고 찰**

본 연구에서는 현대질병에서 중요시되고 있는 당뇨병과 간경변과 같은 전신성질환에 의한 난치성의 만성 속발성으로 오는 신질환의 질환 모델을 연구하기 위하여, Sprague-Dawley 랫드에 streptozotocin을 투여하고 (STZ군), 담도결찰수술을 실시하여(BDL/s군), 각각 당뇨병과 간경변을 유도하여 그에 따른 속발성으로 오는 신질환을 일으키고자 하였다.

STZ군은 streptozotocin을 투여한 후, 1주에서 혈당치는 대조군보다 높게 유지되면서 진행되었고, 사료소비량, 음수소비량등도 각각 증가를 보이면서 당뇨병의 임상증상의 한 단면인 다음, 당뇨의 증상을 나타내면서 진행되어 15주에는 약간의 단백뇨와 함께 조직학적으로 췌장은 미약한 상태의 췌장염(pancreatitis)을 보이고 신장은 사구체 모세혈관 기저막의 PAS positive 증가의 소견을 보였다. 혈청 크레아틴 농도는 1, 6주 부검시에 대조군에 비하여 유의성 있게 증가를 보임으로 본 streptozotocin에 의한 당뇨병의 신질환 모델에서는 신부전(renal insufficiency)을 나타내면서 진행되었다.

한편 BDL/s군은 담도 결찰 수술이후 뇨중 빌리루빈치가 높게 유지되면서 진행되어 15주의 부검시에는 심한 단백뇨(1,000 mg/d)와 함께 조직학적 소견은 간에서는 cholangiofibrosis소견을 보이고 신장은 메산지움의 PAS positive가 중등도에서 고도의 증가 소견을 보였다. 이때 혈청 크레아티닌 농도는 대조군에 비하여 유의성은 없지만 약간 증가함을 보였다.

조직학적 관찰결과, 15주가 되어야 비로서 STZ군은 사구체내 혈관벽과 glomerular basement membrane (GBM)의 PAS positive의 증가를 보였고, BDL/s군은 glomerular tuft의 용적이 증가하면서, 메산지움 내부에 PAS positive의 증가를 관찰할 수 있었다. 이와같은 결과는 Futoshi 등(1995)과 Yagame 등(1995)이 당뇨병에서 GBM의 thickening과 mesangial matrix의 expansion을 보였다는 결과와 일치하였다고, Kawaguchi 등(1986)이 간경변과 관련된 사구체 병변에서 diffuse mesangial proliferation의 병변을 보고 한것과 Glenn과 Newell(1987)이 cirrhotic glomerulonephritis에서 basement memb.의 thickening과 mesangium의 proliferative change의 specific glomerular change를 보고한 것과 일치하였다.

신장에서 세포외 기질의 변동양상을 알아보기 위하여 세포외 기질중 주요구성성분인 collagen 함량의 변

화를 알아보기 위해 hydroxyproline을 측정하였다. 그 이유는, 신장의 주요 세포외 기질 단백질로는 fibronectin, proteoglycan, laminin, collagen등이 있는데 이중 collagen은 생체내 총 단백질의 약 1/3을 차지하는 주요 단백질이고, 또한 신피질 건조 중량의 약 2%를 차지하고 hydroxyproline은 총 collagen 아미노산중에서 10%를 차지하는 주요성분이기 때문이다(임, 1990). 그리고 어린 rat에서는 collagen의 activity의 변화가 심하기 때문에 adult rat인 13주의 rat을 이용하여 실험하였다(Hasslacher 등, 1984; Jamall 등, 1991). 그 결과 조직학적 변화가 나타나지 않는 6주의 STZ군과 BDL/s군 모두 대조군에 비하여 신장조직에 대한 hydroxyproline치가 각각 35%, 32% 증가함을 보였다. 15주 부검군에서는 STZ군의 신장조직에 대한 hydroxyproline치가 대조군에 비하여 75%가 증가하였고, BDL/s군은 154%증가했다. STZ군의 결과는 다른 연구자들의 결과와 일치하는 것이며(Brownlee 등, 1979; Cohen 등, 1982; Hasslacher 등, 1984), BDL/s군의 결과는 다른 연구자들의 결과를 재입증하는 것이었다(Fisher 등, 1968; Glenn 과 Newell, 1987).

Razzaque등(1994)은 *in situ* hybridization과 immunohistochemistry를 이용한 실험결과, renal fibrosis로 진행되는 동안에는 type III collagen, type IV collagen과 같은 collagen성분의 발현이 약하지만, 신경화에 가까울수록 이들 collagen 단백질의 발현이 증가함을 관찰하였고, Christine 등(1988)은 신경화의 진행중 mesangial matrix에서 collagen type의 phenotypic expression을 연구한 결과 신경화의 초기에는 type IV collagen의 발현이 약간 증가하고, type III collagen은 거의 증가하지 않지만, 신경화로 진행될수록 type IV collagen과 type III collagen이 유의성 있게 증가한다고 보고하였다. 그리고 본 실험의 western blot analysis결과 신장조직내 PIIP와 NC1의 단백질의 합성은 대조군에서는 거의 나타나지 않았지만 STZ군에서는 1주부터 시간이 경과함에 따라 뚜렷히 증가하는 경향을 관찰하였다.

Radioimmunoassay방법보다 안전하고 편리한 ELISA방법을 이용한 혈청내 PIIP의 측정은 STZ군의 1, 6, 15주의 전시험기간에 걸쳐서 대조군보다 증가하는 경향을 보였고, BDL/s군은 1, 6주에서 유의성있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 그러나 BDL/s군에서는 간섬유화에 따른 liver fibrosis에 의해서 혈청 PIIP치가 영향을 받아서 증가한것으로 사료된다. 이것을 입증하는 예로는 1990년 Schuppan은 섬유소성 간질환에서 radioimmunoassay에서 혈청 PIIP치가 증가함을 보고하

였다.

Keller 등(1988)은 plasma creatinine( $>150$  mol/L), proteinuria( $>1g/day$ )인 100명의 신질환 환자에서 radioimmunoassay를 이용하여 serum과 urine PIIP를 측정된 결과, serum과 urine의 PIIP치가 증가하였고, 이것은 사구체와 tubule내에서 PIIP생산과 turnover의 증가의 결과로 나타난 renal matrix의 breakdown과 remodeling에 기인하는 것이라고 보고하였다. 그리고 Ozu(1992)는 nephropathy의 예측시 정상적으로는 사구체에 나타나지 않는 type III collagen의 사구체내 출현 빈도의 증가와, 이에 따르는 혈청내 PIIP치의 증가를 유용한 지표로 사용할 수 있다고 보고하였고, 본실험 결과에서도 대조군에서는 western blot analysis결과 PIIP단백은 거의 생산이 나타나지 않았고, 혈청내 PIIP치도 매우 낮았으나, BDL/s군과 STZ군에서는 매우 높게나와 위의 보고와 일치함을 알 수 있었다.

지금까지는 신질환시에 사구체나 세뇨관의 basement membrane이 주요 성분인 type IV collagen의 biosynthesis가 증가하여 serum이나 urine에서 검출할 수 있다는 연구가 많이 진행되어왔다(Hasslacher 등, 1984). 그러나 Torffuit 등(1989)은 diabetic nephropathy에서 초기에는 NC1이 증가하나 말기로 진행될수록 감소한다고 보고하였고, Keller 등(1992)은 혈청과 뇨중의 NC1은 사구체와 세뇨관의 basement membrane에 acute damage(예 : acute glomerulonephritis, acute interstitial nephritis)가 있을때 증가하여 유용한 지표이지만, 만성신질환에서나 신이식등의 다른 신질환에서는 다양한 증감을 보임으로 유용한 지표로서는 부적절하다고 보고하였다. 그러나 basement membrane collagen type IV(NC1)과는 대조적으로 신질환시에 원인에 관계없이 tubular interstitium과 diseased kidney의 glomerular mesangium에서 ECM의 증가에 따라 type III collagen의 생산이 증가하여 혈청PIIP치가 증가함을 보고하여 혈청 PIIP치의 유용성을 주장하였다.

본실험 결과 간경변과 당뇨병에 의한 만성 속발성으로 유도되는 신질환 모델은 유도시간이 비교적 오래 걸리고, 치사율도 비교적 높았고, 본실험의 실험기간이 신경화의 진행상황은 나타내지만 완전한 말기신의 신경화는 나타내기에는 기간이 짧았다. 하지만 오늘날 중요시 되고 있는 질환인 간경변과 당뇨병이라는 현대 질병에서 전신성질환의 만성속발성으로 오는 신질환 모델의 연구라는 점에서 의의가 있고, 신질환시에 공통점으로 세포외 기질이 증가한다는 신질환의 공통된 기전으로가는 것을 입증했으며, 기본적인 뇨검사(뇨단백)과 biopsy이외에는 적절한 신질환의 진단지표나 진



행양상을 알수 있는 지표(marker)가 없었지만, 본실험에서 실시한 신장의 세포외 기질 단백질 collagen에 관한 hydroxyproline의 측정과 방사선 동위원소를 이용한 radioimmunoassay 방법보다 훨씬 간편하고 안전한 ELISA를 이용한 혈청내의 PIIIP치의 측정은 신질환의 예후와 진행양상을 알 수 있는 좋은 지표로 사료된다.

## 참고문헌

- Brownlee M. and Spiro R.G. (1979) : Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rat. In vivo studies. *Diabetes* **28**:121-125.
- Christine K.A., Carl V.P. and Gregory J.R.(1988) : Phenotypic expression of collagen types in mesangial matrix of diabetic and nondiabetic rats. *Diabetes* **37**:175-181.
- Cohen M.P., Surma M.L. and Van-Yu Wu (1982) : In vivo biosynthesis in streptozotocin diabetes. *Biochem Biophys Acta* **500**:395-404.
- Fisher E.R. and Perez-stable E.(1968) : Cirrhotic (hepatic) lobular glomerulonephritis ; Correlation of ultrastructural and clinical features. *Am. J. Pathol.* **52**:869-890.
- Futoshi Y., Ken-ichi I. and Seiichi M. (1995) : In vivo effects of hyperglycemia on the outcome of acute mesangial injury in rats. *J Lab Clin Med* **125**:46-55.
- Glenn C. and Newell M.D. (1987) : Cirrhotic glomerulonephritis ; incidence, morphology, clinical features, and pathogenesis. *Am. J. Pathol.* **11**(3): 183-190.
- Hahn E.G. and Schuppan D. : Collagen metabolism in liver disease : in Bianchi L., Gerocker W., Landmann L., et al.(eds.)(1983) : Liver in Metabolic disease. Folk Symp. 35. Boston, MTP Press. : 309-323.
- Hasslacher C.H., Reichenbacher R., Gechter F. and Timple R.(1984) : Glomerular basement membrane synthesis and serum concentration of type IV collagen in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* **26**:150-154.
- Jamall I.S., Finelli V.N. and Que H. S. (1991) : A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal. Biochem.* **112**:70-75.
- Karttunen T., Risteli J. and Autio-Harmainen H, et al. (1986) : Effect of age and diabetes on type IV collagen and laminin in human kidney cortex. *Kidney Int.* **30**:586-591.
- Kawaguchi K., and Koike M. (1986) : Glomerular lesions associated with liver cirrhosis; An immunohistochemical and clinicopathologic analysis. *Human Pathol.* **17**(11):1137-1143.
- Keller F., Lyreal Y.S. and Schuppan D.(1992) : Raised concentrations of the carboxyterminal propeptide of type IV(basement membrane) procollagen(NC1) in serum and urine of patients with glomerulonephritis. *Europ. J. Clin. Invest.* **22**:175-181.
- Keller F., Rehbein C., Schwarz A., Fleck M., Hayasaka A. and Schuppan D. et al.(1988) : Increased procollagen III production in patients with kidney disease. *Nephron* **50**:332-337.
- Ozu H. (1992) : Clinicopathological study on the relationship between appearance of type I or III collagen in IgA nephropathy Nippon-Jinzo-Gakkai-Shi. **34**(6): 647-656.
- Razzaque M.S., Koji T., Taguchi T., Harada T., and Nakane P.K.(1994) : In situ localization of type III and type IV collagen-expressing cells in human diabetic nephropathy. *J. pathol.* **174**(2):131-138.
- Rojkind H., Giambone M.A. and Biempica L. (1979) : Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* **76**:710-719.
- Schuppan D.(1990) : Connective tissue polypeptides matrix in normal and fibrotic liver ; collagens and glycoproteins. *Seminars in liver disease* **10**(1): 1-10.
- Schuppan D., Dumont J.M. and Kim K.Y., et al. (1986) : Serum concentration of the aminoterminal procollagen type III peptide in the rat reflects early formation of connective tissue in experimental liver cirrhosis. *J. Hepatol.* **3**:27-37.
- Sterzel R.B., Lovett D.H. and Foellmer H.G., et al. (1986) : Mesangial cell hillocks. Nodular foci of exaggerated growth of cells and matrix in prolonged culture. *Am. J. Pathol.* **125**:130-140.
- Torffuit O., Agardh B., Cederholm B. and Wieslander J. (1989) : A new enzyme-linked immunosorbant assay for urine and serum concentrations of the carboxyterminal domain(NC1) of collagen IV; application in type I(insulin-dependent) diabetes. *Scan J. Clin. Lab. Invest.* **49**:431-439.
- Wingen A.M., Dohner H. and Scharer K., et al.(1987) : Evidence for development changes of type IV collagen in glomerular basement membrane. *Nephron* **45**:302-305.
- Yagame M., Kim Y.G., Sakai H. and Gropoli T. (1995) : Differential distribution of type IV collagen chains in patients with diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephron* **70**:42-48.
- 임천규 (1990) : 사구체 경화증에서의 콜라젠 유전자 표현양식. 대한신장학회지. **9**(4):578-585.