

사구체 수의 증감을 비교할 수 있는 기준 개발

영남대학교 의과대학 병리학교실
김 용 진

영남대학교 의과대학 4학년
이지은 · 이국주 · 최영호 · 홍정석

Standard Index Development for Comparing the Glomerular Number

Yong-Jin Kim

*Department of Pathology
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

Chi Eun Lee, Kook Joo Lee, Young Ho Choi, Jung Suk Hong
Senior, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

- Abstract -

Background: The number of glomerulus has been considered one of the etiologic factors especially for focal segmental glomerulosclerosis. However, glomeruli are too many to calculate them correctly. Although the fractionator method has become convinced, in which they used selected sections, not whole kidney sections, with same intervals, it is also very hard to get good results. Because it is still very time-consuming and laborous work which leads to make big observers' biases.

Methods and Materials: We designed the index for glomerular number to estimate the tendency of increase or decrease of the number of it in different kidneys and which was evaluated by other conventional methods including fractionator method. Index was based upon the theory by Nyengaard: "the number of glomerulus correlates with the weight of kidney, which is positively correlated with body weight". Calculating formula is the number of glomeruli/surface areas of cortices.

책임저자 : 김용진, 대구시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 병리학교실 TEL. (053) 620-3331 FAX. (053) 656-1429
E-mail : yyjjkim@med.yu.ac.kr

- ※ 1) 본 연구는 2000학년도 영남대학교 학술 연구 조성비의 지원으로 이루어졌습니다.
- 2) 본 논문의 일부 내용은 1999년 전국 대학생 학술 대회에서 발표되었습니다.

which contain calculated glomeruli multiplies by kidney weight/body weight.

Results: We applied this index to kidneys of FGS/Kist mouse and those of RFM/Nga mouse. The former is spontaneous glomerulosclerosis model with heavy protein uria and renal failure and the latter is the mother side of FGS/Kist mouse but has no glomerular disease or protein uria. The number of glomerulus of FGS/Kist mouse was decreased by 30% to those of RFM/Nga mouse.

Conclusion: This index was useful and reliable for estimating the relative glomerular number between two groups.

Key Words: Glomerulus, Number, Morphometry

서 론

사구체 수는 사람의 경우 한쪽 신장에서 약 100만개 정도인 것으로 알려져 있다. 그러나 이것은 80여년 전 누군가에 의해서 주장되어서 지금까지 검정 없이 사용되어져 왔다(Nyengaard 등, 1992). 신장질환의 흔한 형태인 초점성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis)은 하바드의 Brenner(1985)가 흰쥐의 신장 5/6를 절단한 후 남은 1/6의 신장에서 사구체 경화증을 증명함으로써 사구체 수의 감소에 기인할 것으로 알려졌다. 사구체 수가 줄어들어 따라 나머지 사구체들이 보상적으로 여과를 과다하게하여 신기능을 유지하지만, 즉 초기에는 사구체가 비후되어서 기능적으로 적응을 하다가 상황이 장기간 지속되면, 결국에는 비가역적으로 경화되어 버린다는 것이다. 따라서 과여과(hyperfiltration)를 초래할 수 있는 경우, 즉 사구체수의 감소가 이 병의 원인일 것으로 생각하고, 선천성으로 신장의 일부분이 형성부전 되거나, 사고나 질환에 의해서 신장의 많은 부분을 절제한 경우 등에서도 사구체경화증이 생기는 것을 증명하였다(김용진 등, 1997).

따라서 이런 이차성의 경우뿐만 아니라 일차성 사구체 경화증의 경우에도 사구체 수가 적을 것으로 의심을 하고 있으나 실제로 헤아려 보는 것은 불가능하다. 그러나 사구체 수가 줄어들면 주변 사구체들이 보상성으로 비후되는 것에 착안하여 Fogo 등(1990)은 소아의 사구체경화증에서 경화되지 않은 사구체의 크기가 정상이나 미세변화 신증에 비하여 보다 크다는 사실은 사구체 수가 적기 때문인지 않을까 하는 의문을 제기하였다. 실제로 사구체의 크기가 정상에 비해 큰 미세변화 신증의 경우, 추적 검사에 의해 사구체 경화증으로 밝혀지는 경우를 보고하면서 더욱 사구체 수의 감소나 비후의 중요성을 강조하였다(Fogo 등, 1990).

이상의 예로서 사구체 수를 검증하는 것은 사구체 질환의 예측 및 예후 판정에 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있으나 지금까지 알려진 방법들(Sterio, 1984; Gundersen 등, 1988; Bertram 등, 1992; Hellmann 등, 1999)은 너무나 많은 시간과 노력이 들어서 쉽게 적용할 수 없다. 특히, 사구체경화증에서 사구체 수를 헤아려 보는 일은 실험동물에서만 가능하겠지만 사구체경화증의 실험모델이 신장 부분 절제술

혹은 puromycin 주입 등 인위적인 모델들(오훈규 등, 1998)이어서 의미가 없으며 자연발생적 사구체 경화증 모델이 필요하다. 1991년 KIST에서 CBS/Nga mouse와 RFM/Nga mouse의 교배에서 얻은 잡종을 5대에 걸쳐 근친 교배하여 자연적으로 사구체 경화증을 일으켜서 신부전증에 빠지는 FGS/Kist mouse를 개발하였다(Hyun 등, 1991). 이 FGS/Kist mouse는 태어난 후 6~8주에서 단백뇨를 보이기 시작하여 3~4개월 사이에 심한 단백뇨를 보이고 신부전증에 빠지는 등 사람의 사구체 경화증과 대단히 유사함이 증명되었다(Lee 등, 1996).

이와 같은 사실에 착안하여 선천적으로 사구체 경화증을 일으켜서 신부전증에 빠지는 FGS/Kist mouse를 대상으로 이 종의 기원이 되는 다른 mouse와 사구체의 숫자를 지금까지 개발된 방법으로 비교하고 그것을 기준으로 간편한 방법을 개발하여 쉽게 적용할 수 있도록 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험에 사용한 동물은 이유가 끝난 연령 4주 및 단백뇨가 시작되면서 사구체 경화증이 거의 없는 8주의 FGS/Kist mouse 암수 각 세 마리와 그 선조이면서 신 질환이 없고 일반적 mouse와 생리적으로 거의 동일한 것으로 알려진 RFM/Nga mouse 암수 각 3마리씩 총 24마리를 사용하였다.

2. 실험 방법

실험 동물은 정확한 연령이 되면 몸무게를 측정 한 다음 ether로 흡인 마취하여 복부를 정중 양으로 열어 좌우측 신장을 적출하였다. 적출

한 신장은 무게를 측정한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

(1) 표본의 제작

고정된 신장은 연속 절편을 만들기 위하여 절단하지 않고 전체로 계열 알코올로 탈수하고 클로르포름으로 치환하여 파라핀에 침투 시켜 신장의 장축으로 포매하였다. 절편은 3 μ m의 두께로 첫 장부터 모두 제작하는 방법(약 3,000절편)과 일정 간격으로 제작(약 300절편)하는 두 가지 방법을 이용하여 PAS 염색을 시행하였다.

(2) 사구체 수의 측정방법

사구체 수를 효과적으로 측정하는 방법을 정하기 위하여 신장 하나를 3 μ m 간격으로 모두 잘라서 염색을 한 다음, 다음과 같은 방법들을 이용하여 그 효율성 및 정확성을 비교하여 보았다.

① 모든 절편의 사구체 수를 전부 헤아린 뒤 각 절편 사이에 중복되는 사구체를 빼는 방법(그림 1).

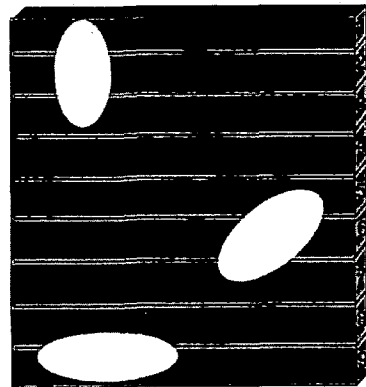


Fig. 1. Diagram of overlapping glomeruli.

이때 피질에 있는 사구체와 방수질부(juxtamedullary)에 있는 사구체의 크기가 다르기 때문에 절편상에 겹치는 횟수도 차이가 있을 것

으로 생각되어 피질과 방수질의 사구체를 구분하여 측정하였다. 그리고 피질과 방수질 부위의 사구체 분포에도 차이가 있기 때문에 그 수를 보정해주기 위해서 다음과 같이 하였다. 전체 절편에서 20절편당 하나를 선택해서 사구체 수를 측정하는데 이때 피질과 방수질에 각각 몇 개씩 속하는지를 측정하였다.

$$\bullet \text{ ovl} = \frac{\text{ovlc} \times c + \text{ovlj} \times j}{\text{Nc1} \times c + \text{Nj2} \times j}$$

c = 피질에 속하는 사구체 수

j = 방수질에 속하는 사구체 수

ovlc = 피질이 사구체에 중복되는 총 합

ovlj = 방수질이 사구체에 중복되는 총 합

Nc1 = 피질의 사구체 측정 개수

Nj2 = 방수질의 사구체 측정 개수

$$\bullet \text{ Novl} = n / \text{ovl}$$

Novl = 중복으로 보정한 사구체 수

n = 연속절편의 수

ovl = 사구체가 겹치는 절편의 수

② 모든 절편의 사구체 수를 전부 헤아린 뒤 사구체 평균 직경을 구하여 중복이 추정되는 두께만큼의 절편 수를 생략하는 방법(그림 1).

사구체의 직경을 절편의 두께로 나누면 사구체가 몇 번 잘려지는 지를 알 수 있고 따라서 그 값만큼을 제하면 여러 번 측정된 것을 보정할 수 있을 것이다. 이때 직경 역시 피질과 방수질을 구분하여 측정하였고 위와 같은 방법으로 보정해 주었다.

$$\bullet D = \frac{Dc \times c + Dj \times j}{\text{Nc2} \times c + \text{Nj2} \times j}$$

Dc = 피질의 직경의 총합

Dj = 방수질의 직경의 총합

Nc2 = 피질 사구체 측정한 개수

Nj2 = 방수질 사구체 측정한 개수

$$\bullet \text{ Ndia} = n / D$$

③ Gunderson등이 개발한 fractionator 방법(그림 2).

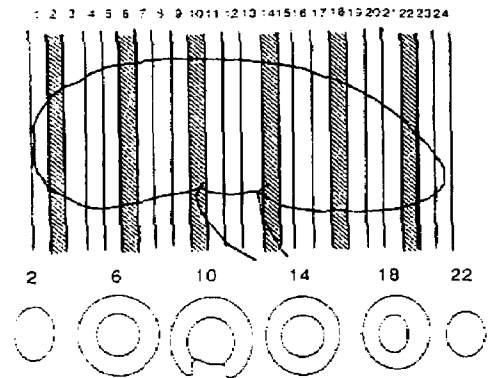


Fig. 2. Digram of fractionator method.

이 방법은 전체 신장에서 알고 있는 fraction을 뽑아 내어 sample을 만든 다음 그 fraction 내의 사구체 수를 측정하는 방법이다. 신장 내 총 사구체 수는 sampled fraction의 수와 fraction내의 사구체 수를 통해 산정 된다. 3 μm로 미리 잘라둔 slide를 60 μm 간격으로 뽑았다. 즉 1에서 21 절편 중 하나를 선택하고 다음 21 절편마다 하나를 선택해서 총 절편 중 1/21의 사구체 수를 측정해서 그 결과에 21을 곱하였다. 이 방법으로 비교하기 위하여 RFM mouse 3마리와 FGS-Kist mouse 3마리의 사구체 수를 측정하였다. 이때 신장의 사구체 수에 성별에 따라서 다르고 또 좌우에 따라서도 다르기 때문에 암컷 오른쪽 신장을 선택해서 하였다. 이때는 우선 2 mm로 신장을 자른 다음에 각 조각에서 처음 4 μm 자르고 look-up section을 위해

한번 더 4 μm 로 자르고 60 μm 는 그냥 지나가고 다시 4 μm 로 두 section을 자르는 방식을 택하였다. 전체를 4 μm 로 자른 다음에 선택하는 것보다 이것이 시간이 적게 걸리기 때문이다. 이렇게 측정된 다음 그 수에 3/63을 나누면 전체 사구체 수가 나온다.

④ 새로 고안한 방법: 일정 면적의 피질에 속한 사구체 수를 측정하여 그 신장의 무게로 보정하는 방법(그림 3).

A: 사구체 수 / 피질 면적 \times 신장무게 \times 1000
B: A / 체중

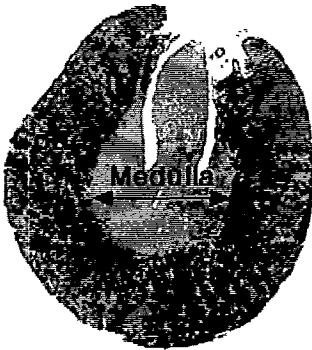


Fig. 3. Coronal section of whole kidney. Cortex and medulla can be differentiated by PAS stain.

다른 방법에 이용한 절편 중에서 피질과 수질의 경계가 뚜렷이 구분되어 나오는 절편을 신장 한 개당 4장씩 골라서 현미경에서 피질의 면적

을 구한 다음 거기에 포함된 사구체 수를 헤아리고 그 수를 면적으로 나눈 다음 신장 무게를 곱하여 개체간에 비교하는 방법을 사용하였다(A). 이것을 다시 몸무게로 나누어서 그룹간에 비교하는 단위로 사용하였다(B).

(3) 통계학적 분석은 Independentsamples T test에 의하여 $p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$ 인 것을 의미 있는 것으로 하였다.

성 적

1. 체중(표 1)

RFM/Nga mouse에 비하여 FGS/Kist mouse의 체중이 약 40% 정도 적었으며 양측 모두에서 암컷이 수컷에 비하여 20% 정도 적었다. 또한 암수 모두에서 주령이 증가함에 따라 체중이 증가하였다($p < 0.01$).

2. 신장의 무게(표 2)

신장의 무게도 체중 증가와 같은 비율로 증가 혹은 감소하였다. 암컷에서 무게가 작았으며 FGS/Kist mouse가 RFM/Nga mouse 보다 작았다($p < 0.01$).

3. 신장의 신체비율(표 3)

신장이 전체 체중에서 차지하는 비율을 계산

Table 1. Changes in body weight of RFM/Nga mice and FGS/Kist mice along the age of week(g)

		4th week	8th week
RFM/Nga mouses	Male	21.867 \pm 1.026	26.467 \pm 0.961
	Female	19.267 \pm 0.379	23.800 \pm 1.473
FGS/Kist mouses	Male	12.950 \pm 0.656	23.400 \pm 0.817
	Female	10.650 \pm 1.300	20.575 \pm 2.285

* Values are expressed as mean \pm SD.

Table 2. Changes in total kidney weight of RFM/Nga mice and FGS/Kist mice along the age of week(g)

		4th week	8th week
RFM/Nga mouses	Male	0.302±0.024	0.375±0.025
	Female	0.236±0.007	0.302±0.013
FGS/Kist mouses	Male	0.136±0.015	0.289±0.007
	Female	0.107±0.009	0.215±0.015

* Values are expressed as mean±SD.

Table 3. Changes in the ratio(%) of kidney/body weight of RFM/Nga mice and FGS/Kist mice along the age of week

		4th week	8th week
RFM/Nga mouses	Male	1.387±0.038	1.417±0.042
	Female	1.227±0.012	1.270±0.026
FGS/Kist mouses	Male	1.050±0.082	1.235±0.059
	Female	1.011±0.048	1.009±0.081

* Values are expressed as mean±SD.

Table 4. Comparative glomerular numbers compensated by kidney weight between female RFM/Nga mice and FGS/Kist mice

	4th week	8th week
RFM/Nga mouses	16002±2343 (100%)	16087±1848 (100%)
FGS/Kist mouses	7056±911 (44%)	7663±1058 (47%)

Glomerular No = No/equal area of cortex × kidney wt

* Values are expressed as mean±SD.

하여 본 결과 주령에 따라 비슷함을 알 수 있었다. 이것은 신장이 체중의 증가와 비례하여 성장하였기 때문으로 생각되었다. 같은 주령의 RFM/Nga mouse에 비교하였을 때 FGS/Kist mouse는 약 20%이상의 감소를 보였다(p<0.01).

4. 사구체 수(표 4, 5)

사구체 수를 4가지 방법으로 측정해 본 결과 첫 번째 방법과 세 번째 방법은 현미경상에서 측정하고자 하는 절편의 앞 뒤 절편에서 중복되는 사구체를 찾아내는 방법으로서 대단히 혼란

스럽고 개인차가 심하였다. 두 번째 방법은 직경을 계산하여 상쇄하는 방법이지만 피질과 방수질 부위의 사구체 직경이 현저히 틀리고 분포 또한 틀려서 일정한 오정 수치를 적용하기 어려워서 오차가 심하였다. 그러나 사구체 수는 신장 하나에 약 350~550개 내외였다.

따라서 우리들은 단위 피질 면적당 사구체 수를 헤아려서 신장의 무게를 곱하여 보정하는 방법을 사용하기로 하였다. FGS/Kist mouse의 사구체 수는 정상적인 RFM/Nga mouse에 비해 44~47%에 불과하였다. 그러나 양측에서 4주

Table 5. Comparative glomerular numbers compensated by kidney weight between female RFM/Nga mice and FGS/Kist mice

	4th week	8th week
RFM/Nga mice	812.2±118.9 (100%)	640.9±73.6 (100%)
FGS/Kist mice	801.8±112.6 (98.7%)	409.7±56.5 (63.9%)

Glomerular ratio = No/equal area of cortex × kidney wt / body wt

* Values are expressed as mean±SD.

에 비해서 8주의 사구체 수는 변화가 없었다. 이 숫자를 체중과 비교하여 보니 4주에는 비록 FGF/Kist mouse의 신장 무게가 작지만 사구체 수가 체중에 비해 부족하지 않으나 8주에는 심하게 부족하게 나왔다. 정상으로 생각되는 RFM/Nga mouse에 비하여 약 1/3이 부족하였다.

고 찰

사구체 수의 측정은 사구체의 기능적 수용력을 판정하는데 중요하게 여겨져 왔고 사구체의 영구적 손상은 만성 신 질환의 중요 병태 생리적 양상으로 생각되어 왔다. 따라서 해부학자들과 병리학자들은 사구체의 구조와 기능이 밝혀지기 오래 전부터 사람을 포함한 여러 포유동물의 신장의 사구체 수를 측정하는 시도를 계속해 왔다. 신장을 갈아서 일정한 양의 액체 속에 사구체가 몇 개가 있는가를 조사하여 전체의 액체 양으로 환산하여 계산하는 법(오훈규 등, 1998), 대상물의 일정한 부분에서 관심물의 개수와 양을 측정하여 전체 대상물에서의 관심물의 총 개수와 양을 계산하는 Gundersen 등(1998)의 fractionator법 등 여러 가지의 방법이 고안되었고 개선되어왔다.

본 연구에서는 신장 전체를 절편으로 만들어서 사구체를 헤아려 보았고, 중복되는 사구체를 앞 뒤 slide를 비교하여 제거하는 방식을 사용

하여서 정확성을 기하려고 노력하였으나 일량이 너무 많아서 현실성이 없다고 판단되었으며, fractionator 방법을 사용하였을 때는 일량이 많이 줄었지만 이 역시 측정자에 따른 개인차가 심하여 그 신빙성이 의심스러웠다. 따라서 이 방법을 이용하려면 측정자간의 기준을 일정하게 조정하는 노력이 가장 필요하다고 느꼈으며 일시적으로 간편하게 이용할 수 있는 방법은 아니라고 생각하였다. 본 실험의 목적처럼 정상 신 기능의 동물과 비정상을 비교하기 위해서는 꼭 절대치가 필요하지는 않다고 생각하여 비교치를 구하는 것이 훨씬 효용 가치가 있다고 판단하였다. 비교치를 구하기 위하여 사구체의 수는 신장의 무게와 비례하고 이는 체중과 비례한다(김용진 등, 1997)는 이론을 근거로 피질의 단위 면적당 사구체 수를 헤아려서 신장 무게 및 체중으로 보정하였고 이 방법이 가장 유의성 있는 것임을 알 수 있었다.

고안한 비교치 환산 방법으로서 FGS/Kist mouse의 사구체 수를 검증하였더니 4주에서부터 정상에 비해 큰 감소를 보이지만 체중에 비해서는 차이가 없었다. 그러나 8주가 되면서부터 체중에 비해 급격한 사구체 부족현상을 보였으며 정상으로 간주하는 RFM/Nga mouse에 비하여 약 1/3이 부족함을 알 수 있었다.

또한 실험쥐에서 생후 8주까지는 주령이 증가함에 따라 체중 및 신장의 무게는 증가하였으나

사구체의 숫자는 일정하였다. 따라서 유전적으로 사구체 수가 정해졌다는 점을 알 수 있었고 그 이후 신장무게의 증가는 사구체의 크기 및 세포의 크기가 커지고 세포간의 간질의 양이 증가되었기 때문일 것이다.

이러한 비교치 방법을 사람의 신 침생검에 적용하기에는 조직의 크기가 너무 적어서 무리가 있으나 동물실험에서는 활용가치가 높다고 생각한다. 그러나 신장 이식의 경우는 공여자 및 수여자의 체중을 알 수 있고 공여자의 신장 무게를 측정한다면 간접적으로나마 이식된 신장의 사구체 수가 적정한지를 평가할 수 있을 것이다.

요 약

신장 질환의 일부는 특히 초점성 분절 사구체 경화증, 사구체 수의 감소를 원인의 중요 요소로 생각하고 있지만 사구체수의 증감을 알 수 있는 신빙성 있는 계산법은 없다. 최근 신장을 일정 간격으로 절편을 만들어서 사구체 수를 헤아린 다음 전체 절편수를 곱하여 절대치를 구하는 방법이 인정을 받고 있지만 시간적으로 인력적으로 많은 노력이 필요하여 현실적 적용은 어렵다.

연구자들은 선천성으로 사구체 경화증이 생기면서 신기능 부전에 빠지는 FGS/Kist mouse와 모계나 병이 없는 RFM/Nga mouse의 신장을 이용하여 편리한 방법의 사구체 계산법을 개발하였다.

과거에 개발된 방법으로 사구체 수를 헤아려 본 결과 절편을 이용한 계산법은 시간과 노력이 너무 많이 걸릴 뿐 아니라 개인차가 심하여 부정확하였다.

따라서 사구체의 수는 신장의 무게와 비례하고 이는 체중과 정비례한다는 이론을 적용하여

임의로 선택한 신장 절편 20개를 이용하여 사구체 수를 헤아린 다음 피질의 면적으로 나누고 이를 체중으로 나눈 신장무게로 곱해주는 비교치 계산 방법을 고안하였다(사구체 수/피질면적×신장무게/체중).

이 방법으로 FGS/Kist mouse의 사구체 수는 질환이 없는 mouse에 비하여 30%정도 감소되어 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 김용진, 김용선, 서재홍: 5/6 신적출된 동물모델과 신생검에서 초점성 분절성 사구체 경화증의 형태학적 비교. 대한병리학회지 31: 100-111, 1997.
- 오훈규, 김용진, 박미옥, 이철호, 현병화, 서인수: FGS/NgaKist 백서신의 형태 및 TGF- β 의 표현. 대한병리학회지 32: 35-42, 1998.
- Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB: Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. Cell Tissue Res 270: 37-45, 1992.
- Brenner BM: Nephron adaptation to renal injury or ablation. Am J Physiol 249: F324-337, 1985.
- Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, Macdonell RB, Ichikawa I: Gemerular hypertrophy in mininal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. Kid Int 38: 115-123, 1990.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF,

- Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, et al.: The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 96: 857-881, 1988.
- Hellmann H, Davis JM, Thurau K: Glomerulus number blood pressure in the Prague hypertensive rat. *Kidney Int* 54(supl 67): S211-312, 1999.
- Hyun BH, Wakasugi N, Nose M, Saito T, Tomita T: A new mouse strain manifesting high proteinuria and kidney glomerular defect. *Lab Anim Sci* 41: 442, 1991.
- Chul-Ho Lee, Yong-Jin Kim, Yoon-Yi Nam, Yang-Kyu Choi, Yong-Joon Kim, Jae-Yoon Choi, Takeshi Tomita, et al.: Pathologic observation of FGS/NgaKist mice with glomerulosclerosis. *Korean J Lab Anim Sci* 12: 51-59, 1996.
- Nyengaard JR, Bendtsen TF: Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232: 194-201, 1992.
- Sterio DC: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc (Oxford)* 134: 127-136, 1984.
-