

흰쥐 콩팥여과관문의 노화 변화에 관한 투과전자현미경적 연구

이세정, 임형수¹, 임도선², 황덕호*

서울대학교 의과대학 해부학교실,

¹제주특별자치도 지방경찰청 수사과 과학수사계, ²서울보건대학 치위생과

The Transmission Electron Microscopic Study on the Alteration of Filtration Barrier in Aged Rat Kidney

Se Jung Lee, Hyoung-Soo Lim¹, Do-Seon Lim² and Douk Ho Hwang*

Department of Anatomy, College of Medicine, Seoul National University,

¹Crime Scene Investigation Section, Criminal Investigation Division,

²Department of Dental Hygiene, Eulji University

(Received April 25, 2008; Accepted June 19, 2008)

ABSTRACT

The filtration barrier of kidney consists of endothelial cell, glomerular capillary, glomerular basement membrane, mesangial matrix, and podocyte. In aged rats, the morphological changes were shown in various parts, including the glomerulus. These changes were thickening of basement membrane and mesangial matrix, crescent formation of glomerular capillary, deformity of foot processes, glomerular sclerosis and obsolescence. But these glomerular morphologies are partial images or few serial images analysis. In this study, we examined the morphological alteration of glomerulus in the young and aged rats by light microscopy, transmission electron microscopy and three dimensional reconstruction. We were found in aged rat glomerulus, expansion of urinary space and mesangial matrix, thickening and degrading of glomerular basement membrane, decreasing in podocyte foot processes, fragmentation of podocytic nucleus membrane. These observations indicate that may provide useful data for investigating the pathogenesis of age-related dysfunction of kidney.

Keywords : Kidney, Podocyte, Glomerular basement membrane, Filtration barrier, 3D reconstruction

서 론

콩팥에서 토리뭉치(glomerular tuft)의 기본구조는 하나의 모세혈관으로 이루어지는데, 토리바닥막(glomerular basement membrane)은 토리뭉치의 일차구조를 지지해주고 있고 내피세포(endothelial cell)와 혈관사이세포(mesangial cell)는

토리바닥막 안쪽에 위치한다. 토리바닥막 바깥쪽에 존재하고 있는 발세포(podocyte)의 경우 치밀한 세포구조를 가지고 있는 독특한 형태로서, 세포돌기는 세포체에 인접한 일차돌기(primary foot process)와 일차돌기에 또다시 분지한 이차돌기(secondary foot process)로 구성되어 있다(Bertram et al., 1989; Mundel & Kriz, 1995; Kriz et al., 1996; Ohno et al., 1996; McCarthy, 1997; Takahashi, 2002; Pavenstadt et al.,

* Correspondence should be addressed to Douk Ho Hwang, Department of Anatomy, Seoul National University College of Medicine, 28 Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-799, Korea. Ph.: (02) 740-8214, Fax: (02) 745-9528, E-mail: shc102@hanmail.net

2003).

노화가 진행된다면 콩팥의 기능과 구조의 변화가 일어나는데, 겔질에 초점을 맞추어 이에 따른 형태 변화를 연구한 논문이 일찍부터 발표되어 왔다. 그 중 토리의 변화를 연구한 논문들을 살펴보면 토리바닥막의 비대와 토리모세혈관의 위축 현상, 발세포의 변형, 혈관사이바탕질의 확장 등을 생쥐, 흰쥐, 사람에게서 관찰할 수 있었다고 보고되어 있다. 이와 같은 형태 변화는 결국 토리의 경화(sclerosis)와 퇴화(obsolescence), 토리혈관구조(renal vasculature)의 손상으로 이어져 콩팥의 여과율과 혈류량의 감소로 나타나게 된다고 보고되어 있다(Gray et al., 1982; Haley & Bulger, 1983; Bell et al., 1984; Anderson & Brenner, 1986; Glodstein et al., 1988; Baylis & Schmidt, 1996; Yu et al., 1998).

이 중 흰쥐의 경우 평균수명이 길지 않고, 사는 동안 노화에 따른 콩팥의 형태변화를 쉽게 관찰할 수 있다고 보고되어 있다(Anderson & Brenner, 1986; Glodstein et al., 1988; Kriz et al., 1996). 이와 같이 노화에 따른 토리의 형태 변화를 관찰하기 위하여 연구자들은 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 이용하여 연구하고자 하였다. 그러나 대부분 토리의 형태변화에 관한 연구는 단면 혹은 몇 장의 연속절편만을 관찰하고 기술하였기 때문에 입체적인 구조에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 광학 및 투과전자현미경적 관찰로 노화 흰쥐의 토리 형태를 성숙한 흰쥐와 비교하고, 이를 바탕으로 연속절편을 시행한 후 컴퓨터 프로그램을 기반으로 3차원 재구성을 시행하여 토리의 일부 구조의 변화를 입체적으로 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 조직처리

SPF (specific pathogen free) 상태인 생후 12주의 성숙한 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 10마리와 병리적 소견이 관찰되지 않은 24개월이 지난 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 10마리를 본 실험에 사용하였다. 각각의 흰쥐는 ethyl ether를 이용하여 마취시킨 후 심장을 통해 0.05 M PBS (phosphate buffer saline)로 관류 후, 이어서 4% paraformaldehyde (0.05 M PBS, pH 7.4)로 30분간 고정하였다. 그 후 콩팥을 적출한 후 이 중 일부는 4% paraformaldehyde 고정액에 넣어 4°C에서 24시간 고정을 시행한 후, 0.05 M PBS로 세척한 후 12, 16, 18% sucrose solution에 넣어 탈수를 유도하였다. 그리고 일부는 겔질을 절취하여 1 mm³ 간격으로 자른 후, 4% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde가 혼합된 고정액에 넣어 4°C에서 24시간 고정을 시행하였다.

2. 투과전자현미경적 형태 관찰

고정이 끝난 조직은 완충용액(pH 7.2, 0.125 M HEPES + 0.01 M glycine buffer)으로 세척한 후, 1% Osmium tetroxide (pH 7.2, 0.125 M HEPES)에 1시간 30분 동안 후고정 처리를 하였다. 그 후 완충용액(pH 7.2, 0.0625 M HEPES)으로 세척한 후 실온에서 30~100% 에탄올(ethanol)에서 각 10분씩의 탈수과정을 거쳤으며, propylene oxide를 이용한 치환과정을 거친 후, epoxy resin (Epon embed 812)에 포매하여 중합반응을 유도하였다. 완성된 Epon block으로 준초박절편(semithin section)을 제작하였고, toluidine blue로 염색을 시행하여 원하는 부위를 확인하였다. 그 후 70 nm의 초박절편(thin section)을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 실온에서 중금속 염색을 시행하여 JEOL 1200EX-II 투과전자현미경으로 관찰하였다.

3. 컴퓨터 프로그램을 이용한 3차원 재구성

3차원적 재구성을 위하여 순서별로 80 nm로 자른 연속절편(serial section)을 제작하여 0.3% formvar solution (in ethylene dichloride solution)으로 코팅을 시행한 one-hole grid에 부착하였다. 그 후 uranyl acetate와 lead citrate로 실온에서 중금속 염색을 시행하여 JEOL 1200EX-II 투과전자현미경으로 토리의 일부를 각각 4,000, 10,000배로 관찰하였다. 3차원 재구성을 위한 프로그램으로 미국 Univ. Colorado에서 개발된 Midas와 IMOD (Ver. 3.5.5, <http://bio3d.colorado.edu/index.html>) program을 사용하였다. 이 프로그램을 사용하기 위한 시스템의 사양으로는 Mobile intel pentium 4 CPU 2.2 GHz, ATI Mobility RADEON 9700 64 MB graphic card, 512 MB Memory, 17 inch Monitor를 사용하였고, 운영체제(O/S)는 Window XP (HOME)를 사용하였다. 영상(image)의 사양으로는 MRC 영상 파일(image file)의 형태로 format된 것을 사용하였는데, 그 방법을 소개하자면 다음과 같다. 우선, 각각의 배율로 찍은 연속 절편 필름을 EPSON perfection 1650을 이용하여 스캔(scan)을 시행하였다. 스캔된 사진은 동일한 크기의 TIFF image 형태의 파일로 변환한 후 각각의 사진에 대한 축 정렬(image alignment)은 Midas program을 이용하였다. 이후, 정렬된 사진은 IMOD program을 이용하여 발세포의 핵, 바닥막, 발세포의 세포돌기, 혈관사이세포, 혈관내피세포를 구분하여 색을 지정하였다. 표지 작업은 약 2,000 포인트(point)로 하여 완성된 각 표본에 대해 3차원적 재구성을 시행하였다.

4. 냉동절편을 이용한 면역조직화학법

Sucrose series로 탈수를 시행한 콩팥 조직을 OCT compound에 포매한 후 액체질소에 냉각시켜 얼린 다음, 냉동절

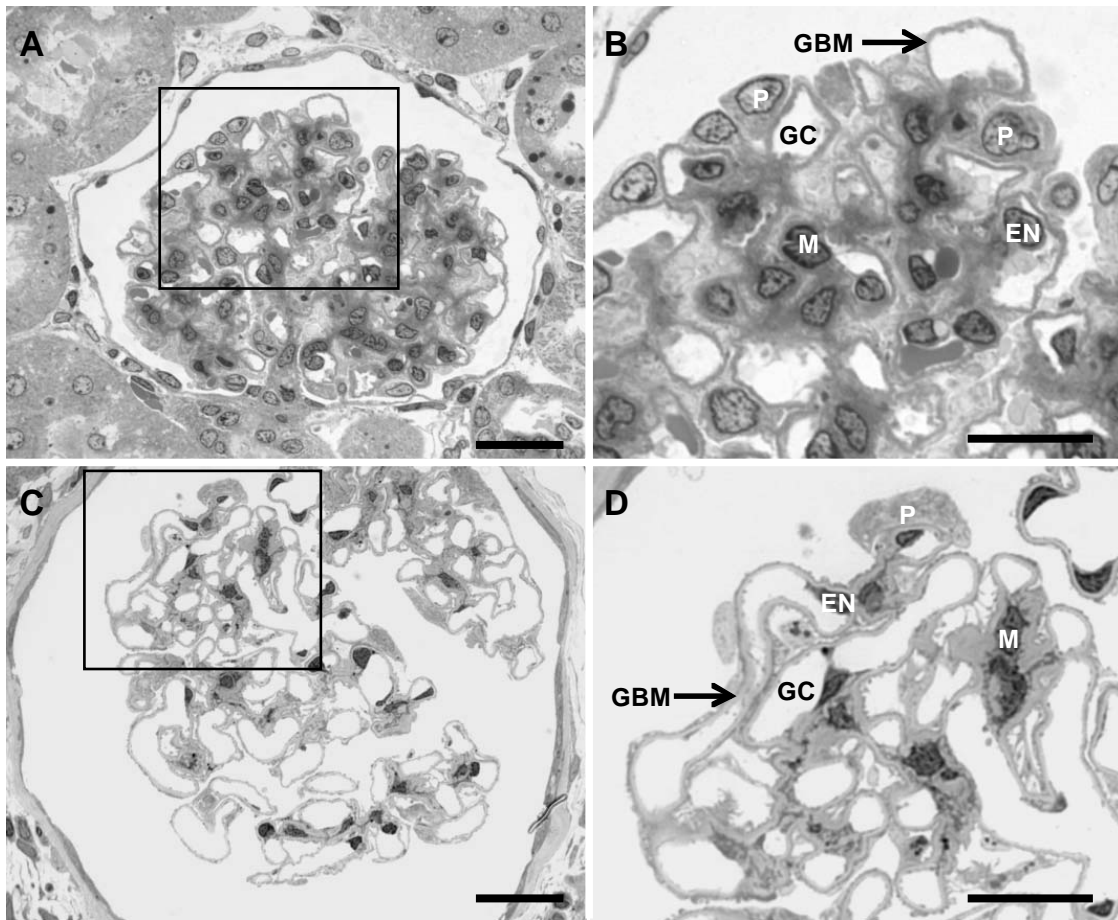


Fig. 1. Photomicrograph of toluidine blue staining of glomerulus in the young (A, B) and aged rats (C, D). B, D are a higher magnification of the rectangle in A, C respectively. In the aged rats, expansion of the urinary space and crescent forming of capillary endothelial cell, thickening of glomerular basement membrane were observed. EN: Glomerular capillary endothelial nucleus, GBM: Glomerular basement membrane, GC: Glomerular capillary, M: Mesangial cell, P: Podocyte. Bars: 50 μ m, \times 1,000.

편기를 이용하여 10 μ m 두께로 제작하여 gelatin을 입힌 슬라이드에 부착시킨 후 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음, 조직처리 전까지 냉동보관 하였다. 준비된 절편은 0.05 M PBS로 수세한 다음, 1% H₂O₂에서 15분간 반응시켜 내부과산화효소의 활성을 약화시켰다. 그 후 0.05M PBS로 수세한 후 1 : 100 normal horse serum으로 1시간 실온에서 반응시킨 후, Caspase-8 goat polyclonal antibody (Santacruz, SC-6136, USA)를 1차 항체로 하여 1 : 100으로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 그 후 절편을 0.05 M PBS로 수세한 후 biotinylated anti-goat IgG antibody (Vector lab., BA-9500, USA)를 1 : 300으로 실온에서 1시간 반응시키고, Horseradish peroxidase streptavidin (Vector lab., BA-0500 USA)을 1 : 400으로 실온에서 1시간 두어 증폭을 유도하였다. 그 후 DAB용액으로 발색하고, 탈수를 거쳐 hematoxylin으로 대조염색한 후 polymount로 포매하였다.

결 과

1. 성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐 토리의 광학현미경적 소견

성숙한 흰쥐의 토리에서는 벽쪽층과 내장층의 구조물을 뚜렷하게 관찰할 수 있었으며, 발세포, 모세혈관 내피세포, 혈관사이세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 이 중 일부를 고배율로 관찰해보면, 토리모세혈관 내피세포의 핵 모습은 편평상피인 것을 관찰할 수 있었고, 토리바닥막의 두께도 일정한 두께로 나타난 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이에 반해 노화 흰쥐 토리를 관찰해보면, 벽쪽층과 내장층 사이에 존재하는 요공간의 확장이 관찰되었으며, 벽쪽층의 경계 또한 성숙한 흰쥐보다 두꺼워진 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 이 중 일부를 고배율로 관찰해보면, 모세혈관 내피세포의 핵은 정상 핵보다 수축된 형태인 초승달 모

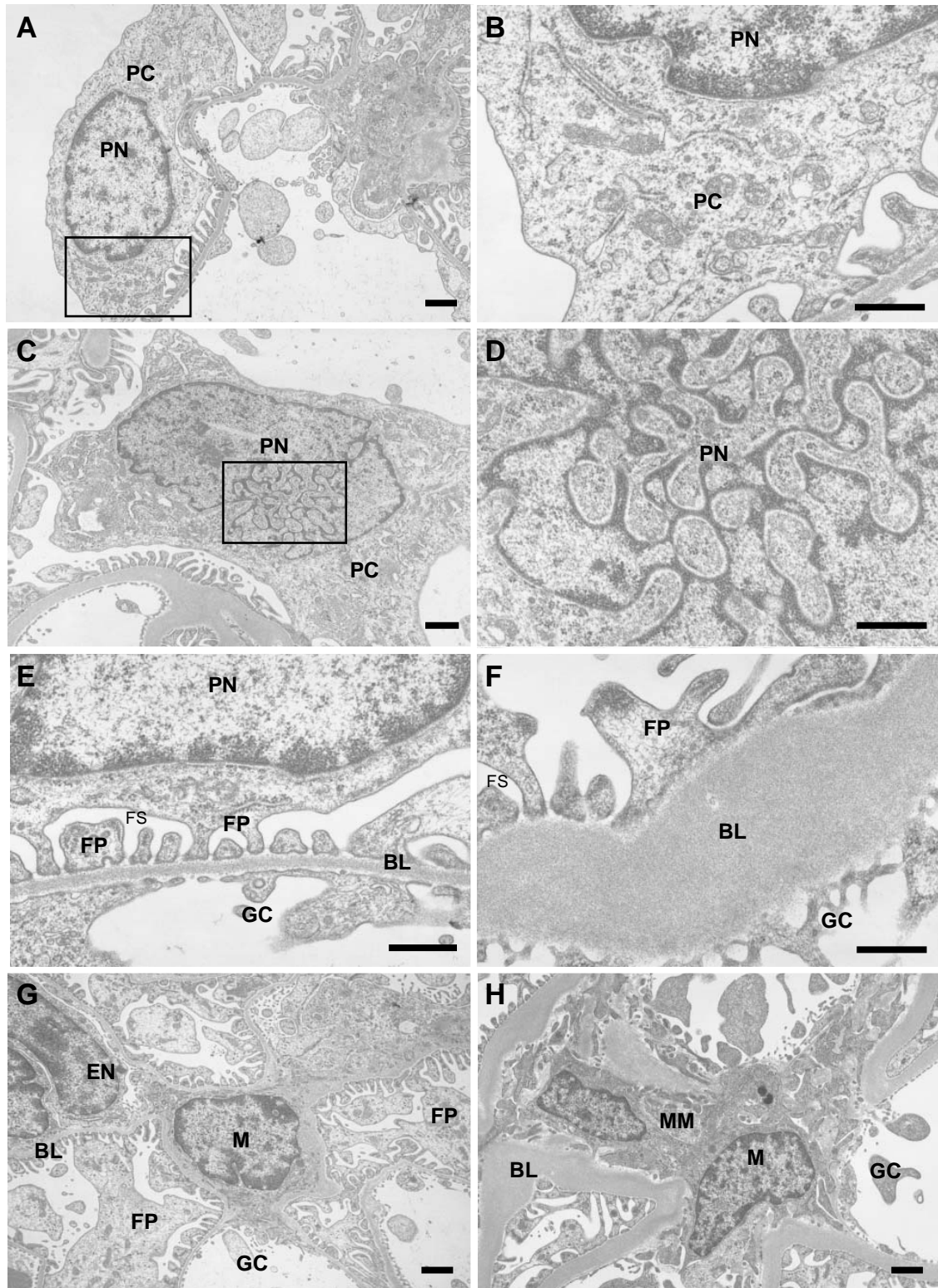


Fig. 2. Transmission electron microscopy of podocyte, basal lamina and mesangial matrix in the young (A, B, E, G) and aged rats (C, D, F, H). B, D are a higher magnification of the rectangle in A, C respectively. In the aged rat podocytic nuclei had a morphology of nuclear membrane blebbing and were divided into several discrete fragment (D). And basal lamina was thickened (F), mesangial matrix were expanded in the aged rat compared to the young rats. However, nuclei of mesangial cell had a similar appearance to that of young rats (H). BL: Basal lamina in glomerulus, EN: glomerular capillary endothelial cell nucleus, FP: Foot process of podocyte, FS: Filtration Slit, GC: Glomerular capillary, M: nucleus in mesangial cell, MM: Mesangial matrix. (A), (C), (G), (H) Bars: 1 μ m, \times 5,000; (B), (D), (E), (F) Bars: 500 nm, \times 20,000.

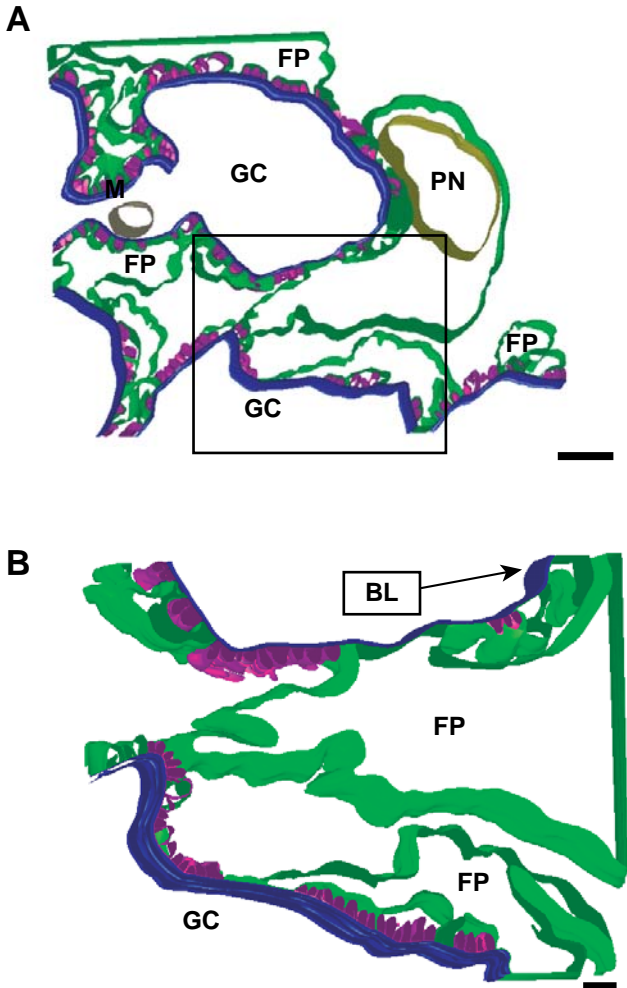


Fig. 3. Three dimensional reconstruction images of foot processes of podocyte in the young rats (A). B is enlarged image of rectangular inset of A. Two glomerular capillaries were observed and foot processes of podocyte were connected with an intact and regularly sized filtration slit. BL: basal lamina in glomerulus (blue), FP: Foot process of podocyte (green), GC: Glomerular capillary, M: Mesangial cell (gray), PN: Podocyte nucleus (yellow). (A) Bar: 5 μ m, \times 4,000; (B) Bar: 2 μ m, \times 10,000.

양으로 관찰되었고, 토리 바닥막의 두께도 두꺼워진 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D).

2. 성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐 토리의 미세구조

성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐의 발세포의 핵과 세포체를 관찰해보면, 성숙한 흰쥐 발세포의 핵은 일반적인 핵의 단면인 타원형이나 원형의 모습으로 관찰되었으며 세포체 구조로 이루어진 세포돌기가 돌기를 내면서 인접한 모세혈관 바닥막에 접하고 있는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, B). 노화 흰쥐에서 발세포 핵의 모습은 핵막의 변형이 진행되어 조각화가 일어나는 양상, 붕괴가 일어나 핵막이 분절

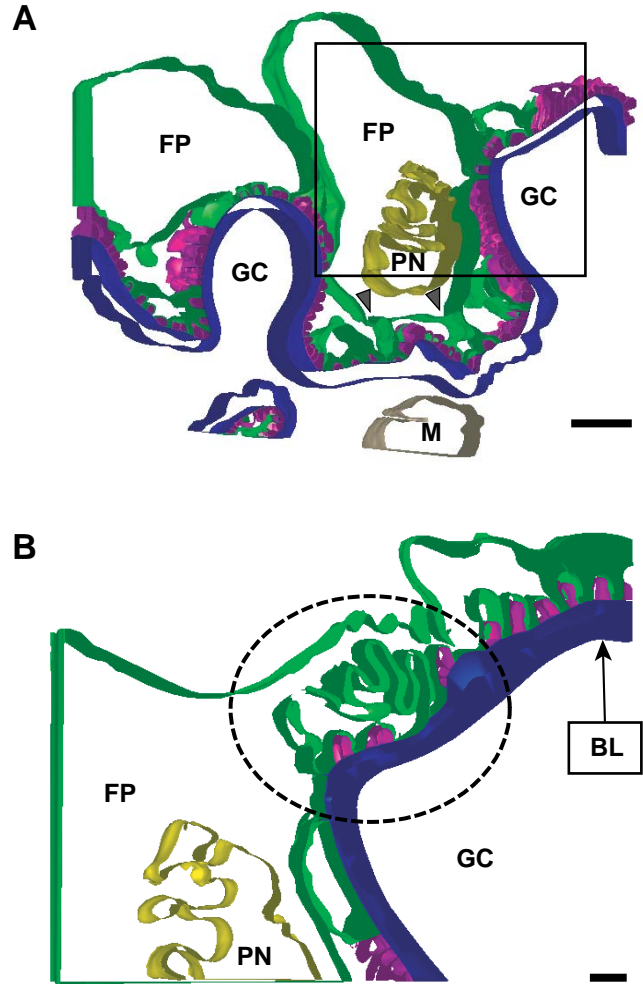


Fig. 4. Three dimensional reconstruction images of foot processes of podocyte in the aged rats (A). B is high magnification image of rectangular inset of A. Note that detachment and segmental thinning of foot processes from the basal lamina were found (red arrow). Some of the detached foot processes were further fragmented inside the podocyte cytoplasm (dotted circle line in B). BL: basal lamina in glomerulus (blue), FP: Foot process of podocyte (green), GC: Glomerular capillary, M: Mesangial cell (gray), PN: Podocyte nucleus (yellow). (A) Bar: 5 μ m, \times 4,000; (B) Bar: 2 μ m, \times 10,000.

된 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C, D). 세포체 구조의 경우는 큰 차이를 관찰할 수 없었다.

바닥막을 살펴보면, 성숙한 흰쥐의 바닥막의 두께는 평균 80 nm로 관찰되었으나(Fig. 2E), 노화 흰쥐에서는 바닥막의 두께가 평균 500 nm로 정상보다 현저하게 두꺼워진 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 2F).

그리고 성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐의 혈관사이바탕질과 핵의 모습을 관찰해보면, 성숙한 흰쥐의 경우 세포체 돌기들이 바닥막과 내피세포 사이에 들어가 있는 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 2G). 노화 흰쥐의 경우, 혈관사이바탕질이 성숙한 흰쥐보다 확장된 것을 관찰할 수 있었으나 혈관사

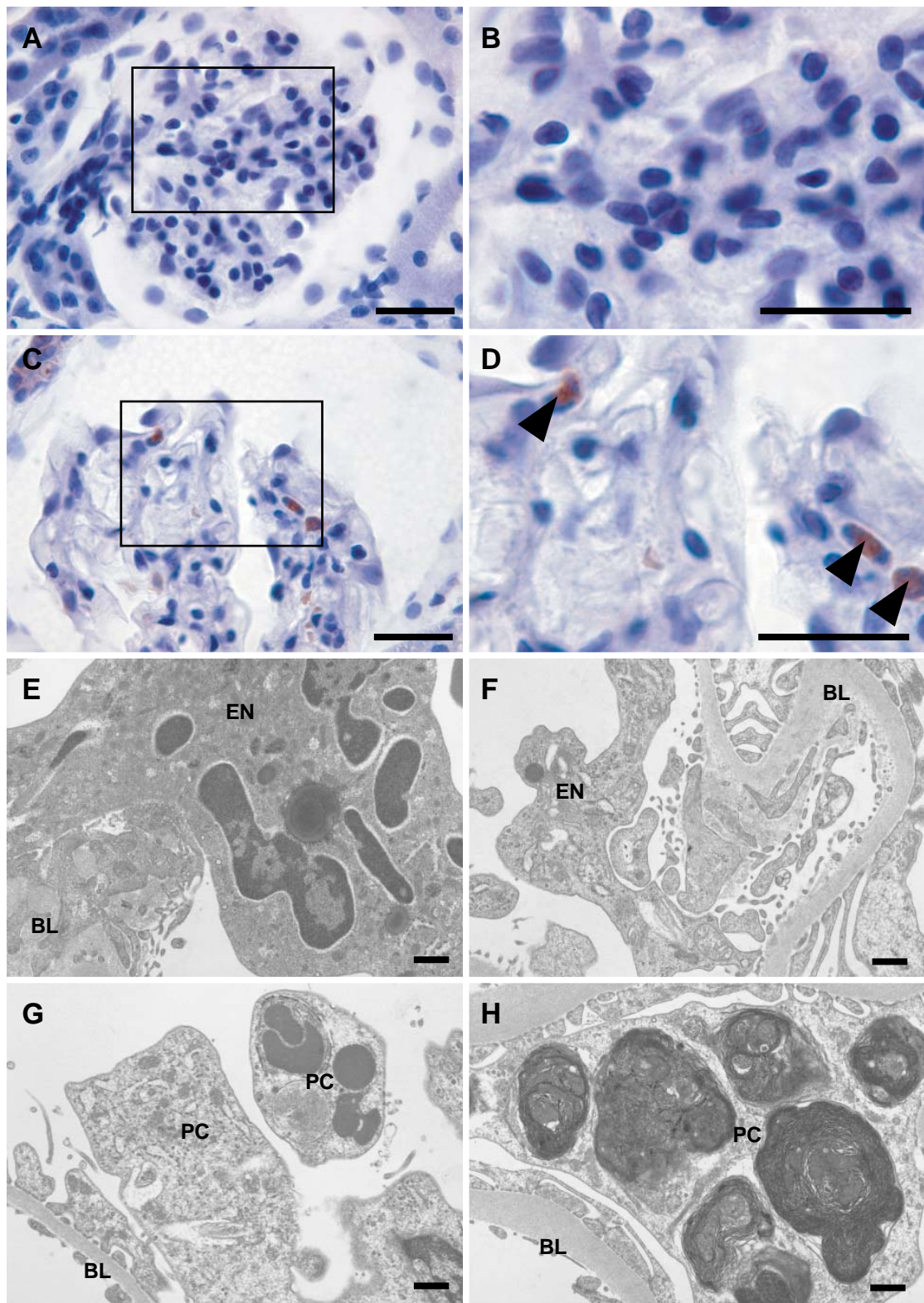


Fig. 5. Photomicroscopy of immunoreactivity (caspase-8) in the young (A, B) and aged rats (C, D) glomerulus and transmission electron microscopy of apoptotic body in aged rats (E-H). B, D are high magnification image of rectangular inset of A, C. Note that, caspase-8 immunoreactivities were some endothelial cell and podocytes in aged rats glomerulus (arrow). Also, apoptotic body in the endothelial cells (E, F) and podocytes (G, H) in aged rat glomerulus. BL: basal lamina in glomerulus, EN: endothelial cell, PC: podocyte cytoplasm. (A)-(D) Bars: 10 μ m, \times 1,000; (E)-(H) Bars: 2 μ m, \times 10,000.

이바탕질안의 핵의 모습은 성숙한 흰쥐에서와 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2H).

3. 성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐 토리의 3차원적 재구성

성숙한 흰쥐의 경우, 저배율로 관찰하여 연속절편을 통해 3차원 재구성을 시행해 본 결과, 혈관사이세포의 핵의 모습과 모세혈관과 내강, 발세포의 핵과 세포돌기 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 이 중 일부를 고배율로 관찰하여 3차원 재구성을 시행해 본 결과, 발세포의 세포돌기는 돌기를 내며 인접한 모세혈관 바닥막에 붙어있었으며, 그 사이에 존재하는 공간인 여과틈새도 일정한 간격으로 나타난 것을 관찰할 수 있었고, 세포돌기의 크기도 비교적 규칙적으로 나타난 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B).

노화 흰쥐의 경우, 저배율로 관찰하여 3차원 재구성을 시행해 본 결과, 바닥막이 두꺼워진 모습과 혈관사이세포 바탕질의 일부 부분에서 바닥막이 경계를 구분할 수 없을 정도로 퇴화가 진행된 것을 관찰할 수 있었다. 발세포의 경우 핵의 형태가 변형된 모습을 관찰할 수 있었고, 발세포의 일부 세포돌기에서는 돌기가 가늘어지면서 그 사이에 존재하는 공간인 여과틈새가 확장된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 이 중 일부를 고배율로 관찰하여 3차원 재구성을 시행해 본 결과, 발세포 핵의 형태가 분절이 일어나 끊어지는 형태를 관찰할 수 있었고, 발세포의 세포체 일부 부분에서 세포체 안에서 붕괴가 일어나 흩어지는 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 4B).

4. 성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐의 세포자멸사 관찰

성숙한 흰쥐와 노화 흰쥐의 세포자멸사를 관찰하기 위해 caspase-8으로 면역조직화학법을 시행해 본 결과, 성숙한 흰쥐에서는 세포자멸사체가 관찰되지 않았으나(Fig. 5A, B), 노화 흰쥐의 경우 일부 내피세포와 발세포에서 핵이 분절되는 형태로 관찰된 세포자멸사체에서 항체반응이 일어난 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5C, D).

이를 바탕으로 노화 흰쥐에서 세포자멸사체의 모습을 투과전자현미경을 이용하여 관찰해 본 결과, 내피세포 안의 핵과 발세포의 세포체에서 포식세포의 형태로 나타나는 세포자멸사체를 관찰할 수 있었다(Fig. 5E-H).

고 찰

토리는 콩팥단위의 초기단계로서, 세 종류의 세포를 포함하고 있다. 우선 벽쪽층과 내장층이 토리의 바깥과 안을 구분해주며, 내장층 안쪽을 살펴보면 모세혈관의 안쪽 면을 구성하는 내피세포, 혈관관쪽에 있는 혈관사이바탕질, 그리

고 모세혈관 바깥쪽에 존재하며 세포돌기 형태가 나뭇가지처럼 뻗어나가는 형태로 나타나는 발세포가 있다. 토리바닥막은 발세포와 내피세포 사이, 그리고 혈관사이바탕질 사이에 존재한다고 보고되어 있다(Abrahamson, 1987; Sakai & Kriz, 1987; Deen et al., 2003; Kobayashi et al., 2004).

생쥐, 흰쥐, 사람에서 콩팥의 노화가 진행되면 콩팥 질량이 줄어드는데 그 이유는 걸질 형태의 소실로 일어나게 되는 현상으로, 이는 토리의 형태학적 변화와 연관이 있다고 보았다. 그 중 흰쥐의 경우 나이에 따라 토리의 노화진행의 특징이 잘 관찰되는 동물이기 때문에 이들의 형태학적 변화를 살펴본 논문이 많이 발표되었다(Haley & Bulger, 1983; Bell et al., 1984; Anderson & Brenner, 1986; Dodane et al., 1991; Abrass et al., 1995; Baylis & Schmidt, 1996; Yu et al., 1998, Ortmann et al., 2004). 주요 특징을 살펴보면 토리바닥막과 혈관사이세포의 비대, 발세포의 변형 현상, 모세혈관 위축과 형태의 변화가 나타나며 결국 토리의 경화나 퇴화로 진행된다고 보고되었다. 흰쥐의 경우 다른 흰쥐의 종보다 노화가 진행되었을 경우 형태 변화를 보다 잘 관찰할 수 있으며 특히 수컷이 토리의 노화에 따른 형태 변화를 더 많이 관찰할 수 있다고 보고되어 있다(Gray et al., 1982; Goldstein et al., 1988).

본 연구에서는 24개월의 수컷의 흰쥐를 광학 및 투과전자현미경으로 관찰하여 성숙한 흰쥐와 비교하여 보았다. 그 결과 노화 흰쥐의 토리에서 기존에 보고되었던 결과와 마찬가지로 요공간의 확장, 토리바닥막의 비대, 모세혈관 내피세포의 초승달 형태, 발세포 핵의 변형과 혈관사이세포 바탕질의 확장을 관찰할 수 있었다.

또한 토리의 구조변화를 관찰하기 위해 시행한 기법은 기존의 논문에서는 대부분 단면을 위주로 한 연구가 대부분이었다. 하지만 모세혈관, 발세포, 바닥막의 연결이 어떤 식으로 이루어지며 이들은 결국 어느 부분으로 이어지는지에 대한 모습을 관찰하고, 발세포의 세포돌기가 활발한 돌기를 내면서 인접한 바닥막에 접하고 있는 모습이 노화가 진행되었을 때는 어떻게 변화하는지, 단면적인 모습과 일치하는지에 대한 사실을 확인하려면 몇 장의 절편으로만 관찰하기에는 무리가 있다고 판단하였다. 물론 토리의 일부구조를 입체적으로 관찰하여 그 결과를 소개하고 있는 논문이 있지만, 이들은 저배율 위주로 전체적인 모습만을 설명하고 있으며, 주로 형태변화보다는 통계적 기술에 그치고 있다(Shea, 1979; Neal et al., 2005). 따라서 연속절편을 통하여 컴퓨터 프로그램을 이용하는 방법으로 토리의 구조를 입체적으로 관찰하는 것이 필요하다고 보았다.

본 연구에서는 성숙한 흰쥐의 토리와 노화 흰쥐의 토리 일부구조를 초미세절단기를 이용한 연속절편을 시행하여 투과전자현미경으로 관찰한 후, 3차원 재구성을 용이하게 해 주는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 관찰하였다. 그 결과,

노화 흰쥐의 토리에서 토리바닥막 두께의 변화뿐만 아니라 혈관사이바탕질쪽 바닥막에서 형태의 변형이 일어나 퇴화가 진행된 모습과 발세포 핵의 변형이 일어나 핵막이 끊어지는 모습을 보다 입체적으로 관찰할 수 있었다. 그리고 노화 흰쥐의 토리에서 발세포 세포돌기 일부의 수축현상에 주목하여 성숙한 흰쥐와 노화의 흰쥐의 발세포 세포돌기의 변화를 저배율과 고배율로 관찰하여 3차원 재구성을 시행해 본 결과, 노화 흰쥐의 경우 발세포의 일부 세포돌기가 가늘어지는 현상이 나타나는 동시에 여과관문의 확장, 발세포 세포체의 일부에서 세포돌기가 바닥막에 인접하는 구조가 아니라 세포체 안에서 불규칙적으로 변형이 일어난다는 사실을 관찰할 수 있었다. 이를 바탕으로 노화가 진행되면 토리의 형태변화가 일어나 토리 구조에 영향을 미쳐 생리학적 기능의 저하가 나타날 수 있다고 추측할 수 있었다.

한편, 발세포는 특징적인 상피세포 중 하나로서 토리여과장벽에서 중요한 역할을 한다는 것은 기존의 논문에서 많이 소개되어 왔다(Pavenstadt, 2000; Kretzler, 2002; Mundel & Shankland, 2002; Asanuma & Mundel, 2003; Barisoni & Kopp, 2003; Pavenstadt et al., 2003; Ly et al., 2004). 그리고 발세포의 세포자멸사나 소실 현상은 노화나 사구체경화증에서 나타나는 주요한 특징이라 보고, 이에 대해 연구를 시행한 논문이 최근 많이 발표되었다(Kerjaschki, 1994; Kriz et al., 1998; Kim et al., 2001; Schiffer et al., 2001; Patrakka et al., 2002; Mundel, 2003; Hughes & Savill, 2005; Ichikawa et al., 2005; Marshall & Shankland, 2005). 본 연구에서도 노화 흰쥐의 토리에서 발세포 핵의 변형과 세포돌기의 가늘어지는 현상, 여과관문의 확장을 투과전자현미경과 3차원 재구성 기법을 통해 확인 할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 노화의 흰쥐에서 이러한 발세포의 변형의 원인이 세포자멸사에 의한 것이 아닐까라고 생각하여, 노화 흰쥐의 토리 결질을 냉동절편하여 세포자멸사에서 나타나는 단백질 중 하나인 Caspase-8 항체로 면역염색을 시행해 보았다. 그 결과 노화의 흰쥐 토리 모세혈관의 내피세포와 혈관사이세포, 발세포 일부에서 세포자멸사가 관찰되었다. 따라서 노화의 흰쥐 토리 안에서 내피세포나 혈관사이세포의 세포자멸사가 토리바닥막과 발세포에 영향을 미쳐 형태 변화가 일어나며, 이로 인해 여과 관문 기능이 저하될 수 있을 것이라는 하나의 가능성을 제시할 수는 있겠으나, 앞으로 이에 대한 연구는 부가적으로 더 시행되어야 한다고 생각한다.

이상에서의 연구와 같이, 노화의 흰쥐에서는 이와 같은 토리 형태의 변화가 나타난다는 것을 3차원 재구성을 통해 보다 자세히 확인할 수 있었고, 나아가 이런 구조적인 변화에 의해 토리의 여과기능과 생리학적 역할이 영향을 받을 수 있다고 결론을 낼 수 있다. 앞으로 노화에 따른 형태변화의 특징을 기반으로 하여 그 원인에 대한 연구가 더 부가적으로 수행되어야 하겠다.

참 고 문 헌

- Abrahamson DR: Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am J Physiol* 253 : 783-794, 1987.
- Abrass CK, Adcox MJ, Raugi GJ: Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *Am J Pathol* 146 : 742-752, 1995.
- Anderson S, Brenner BM: Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 80 : 435-442, 1986.
- Asanuma K, Mundel P: The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 7 : 255-259, 2003.
- Barisoni L, Kopp JB: Update in podocyte biology: putting one's best foot forward. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12 : 251-258, 2003.
- Baylis C, Schmidt R: The aging glomerulus. *Semin Nephrol* 16 : 265-276, 1996.
- Bell RH Jr, Borjesson BA, Wolf PL, Fernandez-Cruz L, Brimm JE, Lee S, Sayers HJ, Orloff MJ: Quantitative morphological studies of aging changes in the kidney of the Lewis rat. *Ren Physiol* 7 : 176-184, 1984.
- Bertram JF, Messina A, Dillane PC, Ryan GB: Glomerular podocytes in cultured rat kidney slices. A qualitative and quantitative electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 256 : 419-429, 1989.
- Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD: Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 281 : 579-596, 2001.
- Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J, Corman B: Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest* 64 : 377-391, 1991.
- Goldstein RS, Tarloff JB, Hook JB: Age-related nephropathy in laboratory rats. *FASEB J* 2 : 2241-2251, 1988.
- Gray JE, van Zwieten MJ, Hollander CF: Early light microscopic changes in chronic progressive nephrosis in several strains of aging laboratory rats. *J Gerontol* 37 : 142-150, 1982.
- Haley DP, Bulger RE: The aging male rat: structure and function of the kidney. *Am J Anat* 167 : 1-13, 1983.
- Hughes J, Savill JS: Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14 : 389-395, 2005.
- Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T: Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14 : 205-210, 2005.
- Kerjaschki D: Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int* 45 : 300-313, 1994.
- Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D, Wiggins R: Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 60 : 957-968, 2001.

- Kobayashi N, Gao SY, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li CY, Pan L, Saito S, Terashita T, Matsuda S: Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anat Sci Int* 79 : 1-10, 2004.
- Kretzler M: Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microsc Res Tech* 57 : 247-253, 2002.
- Kriz W, Gretz N, Lemley KV: Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54 : 687-697, 1998.
- Kriz W, Kretzler M, Provoost AP, Shirato I: Stability and leakiness: opposing challenges to the glomerulus. *Kidney Int* 49 : 1570-1574, 1996.
- Ly J, Alexander M, Quaggin SE: A podocentric view of nephrology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13 : 299-305, 2004.
- Marshall CB, Shankland SJ: Cell cycle and glomerular disease: A minireview. *Nephron Exp Nephrol* 102 : 39-48, 2005.
- McCarthy KJ: Morphogenesis of the glomerular filter: the synchronous assembly and maturation of two distinct extracellular matrices. *Microsc Res Tech* 39 : 233-253, 1997.
- Mundel P: Urinary podocytes: lost and found alive. *Kidney Int* 64 : 1529-1530, 2003.
- Mundel P, Kriz W: Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)* 192 : 385-397, 1995.
- Mundel P, Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13 : 3005-3015, 2002.
- Neal CR, Crook H, Bell E, Harper SJ, Bates DO: Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space. *J Am Soc Nephrol* 16 : 1223-1235, 2005.
- Ohno S, Baba T, Terada N, Fujii Y, Ueda H: Cell biology of kidney glomerulus. *Int Rev Cytol* 166 : 181-230, 1996.
- Ortmann J, Amann K, Brandes RP, Kretzler M, Munter K, Parekh N, Traupe T, Lange M, Lattmann T, Barton M: Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension* 44 : 974-981, 2004.
- Patrakka J, Lahdenkari AT, Koskimies O, Holmberg C, Wartiovaara J, Jalanko H: The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 52 : 349-355, 2002.
- Pavenstadt H: Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 : 173-179, 2000.
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83 : 253-307, 2003.
- Sakai T, Kriz W: The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. *Anat Embryol (Berl)* 176 : 373-386, 1987.
- Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, Ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 108 : 807-816, 2001.
- Shea SM: Glomerular hemodynamics and vascular structure. The pattern and dimensions of a single rat glomerular capillary network reconstructed from Ultrathin sections. *Microvasc Res* 18 : 129-143, 1979.
- Takahashi-Iwanaga H: Comparative anatomy of the podocyte: A scanning electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 57 : 196-202, 2002.
- Yu Y, Leng CG, Terada N, Ohno S: Scanning electron microscopic study of the renal glomerulus by an in vivo cryotechnique combined with freeze-substitution. *J Anat* 192 : 595-603, 1998.

< 국문 초록 >

콩팥의 모세여과관문은 토리모세혈관, 내피세포, 혈관사이바탕질, 토리바닥막, 발세포로 구성되어 있다. 콩팥의 노화가 일어나게 되면 형태학적 변형이 일어난다고 보고되었는데, 그 중 흰쥐의 경우 생쥐나 사람보다 노화에 따른 토리의 형태가 다양하게 관찰된다는 보고가 있다. 하지만 이런 연구들은 대부분 단면 위주로, 형태변화에 관한 입체적인 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 3개월이 지난 성숙한 흰쥐와 24개월이 지난 노화 흰쥐의 토리 모세여과관을 비교하여 그에 따른 형태변화를 광학 및 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 연속절편을 통해 컴퓨터 프로그램을 기반으로 한 3차원 재구성을 시행하였다. 그 결과 노화 흰쥐의 토리에서 요공간의 확장, 모세혈관 내피세포의 변형, 토리바닥막의 비대, 혈관사이바탕질의 확장을 관찰할 수 있었다. 또한 3차원 재구성을 시행한 결과 노화 흰쥐의 토리에서 바닥막 경계의 붕괴 현상, 발세포 핵막의 조각화와 분절 양상, 발세포 세포돌기의 부분적인 수축과 세포돌기의 가늘어짐으로 인한 여과틈새의 확장을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, 노화가 진행되면 토리의 여과관문의 변형으로 인하여 콩팥의 생리학적 역할과 조절이 영향을 받을 것으로 사료된다.