

nephrin의 소실로 단백뇨를 동반한 여러 신사구체 질환에서 post embedding method를 이용한 면역전자현미경적 검사법

우 희 숙

삼성서울병원 진단병리과 전자현미경실

단백뇨를 동반한 여러 신사구체 질환들 -minimal change disease, IgA, nephropathy, lupus nephritis등- 에서 foot process effacement의 원인으로서 nephrin의 수적 변화와의 연관성을 조사하기 위하여 nephrin에 대한 antibody를 이용한 면역전자현미경적 검사를 시행하였다.

정상 대조군 4예와 여러 가지 신사구체질환으로 인하여 단백뇨를 보이는 환자 12예를 대상으로 하였다. 검사 재료로는 핀란드의 헬싱키 지역에 유전자 이상으로 인한 선천성 신증후군 (congenital nephrotic syndrom) 에서 얻은 두가지 polyclonal anti-nephrin antibody들 (intracellular site antibody(k2737), extracellular site antibody(k9)) 을 사용하였으며, second antibody로는 6nm Immunogold conjugate된 Goat Anti-Rabbit IgG (Bio-Cell, British) 를 사용하였다. Embedding medium으로는 LR white Resin (TAAB사) 을 사용하였으며 U/V polymer와 45°C polymer를 하였다. 검사방법으로는 생검된 kidney 검체를 현미경 하에서 사구체의 유무를 확인한 후 3.5% paraformaldehyde와 0.01% glutaraldehyde의 혼합 고정액에 2시간 이내로 고정하였다. phosphate buffer(PH7.4, 0.1M) 로 12시간 이상 수세 후 탈수했다. 탈수는 absolute alcohol 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% 순으로 15분씩 (4°C 냉장고) 시행하였으며, 침투로는 LR white resin과 100% absolute alcohol의 비율을 1:1로 하여 2시간 행하였고 pure LR White resin에서 overnight후 embedding하였다. U/V 및 45°C polymer에서 몇 일 굳힌 후 semi-thin section(1 μ 이내)하여 사구체 유무를 확인한 후 thin section (50-60nm) 하여 formbar carbon-coated nickel grid에 올려 immunogold labling을 시행하였다. 표지방법으로는 시료를 protein blocking serum (DAKO사) 을 이용하여 non-specific한 부분을 제거한 후 polyclonal anti-nephrin antibody들 (1:50 dilution) 에 침적시켰다 (37°C incubation, moisture chamber, 1시간). blocking serum으로 수세 후 Immunogold conjugate된 Goat Anti-Rabbit IgG (1:30 dilution) 로 표지시켰다 (37°C incubation, moisture chamber, 30-40분). 1% glutaraldehyde로 고정 후 DW로 수세하여 dry한 후 4% uranyle acetate와 lead nitrate 로 염색하여 전자현미경으로 75kV에서 15X, 20X, 30X의 배율로 관찰하였다 (Hitachi

7100).

결과로는 정상 대조군으로 Intracellular site (K2737) 에서는 foot process와 foot process사이인 slit membrane에 평균 1-3개 마다 1-3개의 gold particle들이 표지 되었으며, Extracellular site (k9) 에서는 slit membrane 10-15개마다 1-3개의 gold particle 표지되었다. 반면에 단백뇨를 동반한 환자의 경우 이 두가지 antibody 들에 대하여 foot process가 비교적 극소수 정상적으로 유지되는 부분에는 정상 대조군과 비슷한 빈도로 gold particle 관찰되었으나 대부분 foot process effacement가 심한 부위에서는 거의 나타나지 않았으며, effaced foot process길이에 반비례하여 gold particle의 표지수가 현격히 감소함을 잠정적인 결과로 얻을 수 있었다. 이는 단백뇨를 동반한 환자에서는 정상적으로 foot process cell membrane 안에 존재하는 nephrin 의 유지가 불안정하여 정상 대조군에 비해 foot process effacement의 정도에 반비례적으로 gold particle 의 표지수를 감소시켜 사구체의 glomerulus의 선택적 투과성을 변경시킴으로써 단백뇨를 일으킬 가능성을 암시한다. 이는 또한 IEM에서 nephrin의 수적 혹은 질적 변화를 관찰함으로써 foot process의 형태-기능학적 변화를 연관시킬 수 있고, 이를 바탕으로 추후 단백뇨의 기전을 밝히는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.