

선천성 고혈압 흰쥐에 Puromycin Aminonucleoside로 유도된 사구체 손상에 대한 α -tocopherol Acetate의 효과

영남대학교 이과대학 생물학과

이 윤 정 · 박 원 학*

국문초록: 선천성 고혈압 흰쥐를 이용하여 puromycin aminonucleoside (PAN)로 유도된 미세변화신증에 대한 α -tocopherol acetate의 효과를 알아보기 위하여, 정상군, PAN 투여군 (30 mg/kg), 비타민 E 투여군 (200 mg/kg) 그리고 PAN+비타민 E 투여군으로 나누었다. 각 군은 약물 투여 후 2, 4, 8, 16일째 처치하여 혈청 생화학적 변화, 조직학적 변화, 그리고 미세구조적 변화를 관찰하였다. 실험동물의 체중은 PAN 투여군이 가장 낮은 증가율을 보였고, 비타민 E 투여군이 가장 높은 증가율을 보였다. 혈청 총단백질의 함량은 PAN 투여 8일군에서 가장 낮았고, 혈중 요소성 질소와 크레아티닌의 함량은 PAN 투여 8일군에서 가장 높게 나타났다. PAN+비타민 E 투여군에서는 PAN 투여군과 비교하여 혈청 총단백질의 함량이 증가되었고, 혈중 요소성 질소와 크레아티닌의 함량은 감소되었다. 조직학적 관찰 결과, 요세관 공간의 소실과 혈관사이세포의 증식이 PAN 투여 4일군에서 나타나기 시작하여, PAN 투여 8일군에서 가장 현저하였으나 비타민 E 투여로 이러한 변화 정도는 감소되었다. PAS 염색 관찰 결과, 염색 정도가 PAN 투여 8일군에서 가장 강하게 나타났고, 비타민 E 투여로 염색 정도는 감소되어 나타났다. 미세구조의 변화는 PAN 투여 8일군에서 족돌기의 융합과 소실, 모세혈관 내피세포의 공포화, 그리고 혈관사이세포와 사구체 기저막의 증식이 관찰되었고, 비타민 E 투여로 감소되었다. 이러한 결과들로 보아 PAN으로 유도된 사구체 손상은 고혈압에 의해 가중될 수도 있으며, 사구체의 기능이상은 산화적 손상에 의한 것임을 간접적으로 시사하고 있다.

서 론

Puromycin aminonucleoside (PAN)은 앞선 많은 연구들에서 단백뇨나 진행성 사구체 질환 (progressive glomerulopathy)의 원인을 규명할 목적으로 많이 이용되어져 왔는데^{3,10)}, 일찍이 transfer RNA와 구조적으로 유사하여 미생물의 단백질 합성을 저해하는 항생제로 사용되어져 왔으며, 이것을 투여하면 단백뇨를 동반하는 신사구체 질환 등 심각한 부작용이 초래된다고 알려져 있다⁸⁾. 최근 연구들에서 PAN으로 유도된 미세변화신증 (minimal change nephrosis disease) 모델이 만성 신

사구체 질환이나 단백뇨 형성기전을 밝히는데 많이 사용되어 오고 있다^{4,6)}.

PAN 투여로 인한 신장 손상 기전에 대한 형태학적 연구로는 Frenk 등⁸⁾이 기저막의 음이온 소실과 족돌기 (pedicel)의 소실을 보고한 후로 사구체와 보우만 주머니의 유착⁴⁾, 사구체 족세포 (podocyte)의 족돌기 소실과 융합^{16,31)}, 족세포의 공포화 변성^{16,28)}, 족세포 내 높은 전자밀도를 가지는 과립들의 출현^{13,28)}, 기저막 내 음이온 소실^{11,19,22)}, 혈관사이세포 (mesangial cell)의 증식^{5,15)}, 그리고 지방소적의 축적¹²⁾과 같은 변화가 초래된다고 하였다. 또한 생화학적인 변화로 혈중 요소성 질소와 크레아티닌 함량이 증가되고 요중 단백질 및 알부민 함량이 증가된다고 하였다^{16,26)}.

신증에 대한 치료와 예방에 사용되는 제제들은 비타민 E²⁹⁾, 항산화제^{14,18)}, 혈관확장제⁹⁾, 그리고 스테로이드계 약물²³⁾들이 대부분이다. 그 중

* 논문 접수: 1999년 4월 22일

수정재접수: 1999년 5월 12일

† 별책 요청 저자

** 본 연구는 1998학년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었음.

α -tocopherol acetate는 생물체 내에서 노화 과정을 억제시키고, 조직의 손상을 치유하는 데에도 관여하며 활성 산소기에 의한 지질과산화나 지질과산화에 의한 2차적 반응을 차단하는 연쇄절단 항산화제 (chain-breaking antioxidants)로 알려져 있다.^{7,29,30)} 특히 비타민 E는 PAN으로 유도된 신증에서 나타나는 사구체 만월 현상 (crescent formation), 모세혈관 소실, 족세포 내 공포화, 족돌기의 종창현상을 감소시킬 뿐만 아니라²³⁾ 요 단백량, 혈청 내 총 콜레스테롤, 트라이글리세라이드, 크레아티닌, 요소성 질소의 함량을 감소시킨다고²⁹⁾ 하여 신증이 산화적 손상에 의한 것임을 시사하였다.

하지만 이러한 선행연구들은 주로 정상적인 혈압상태를 유지하는 흰쥐를 대상으로 하였을 뿐, 고혈압 상태하에서 유도된 신사구체 질환의 발병 기전과 이에 대한 예방 및 치료 연구는 거의 없는 실정이다. 하지만 Oh²⁰⁾는 선천성 고혈압은 사구체 여과율, 소듐 배설량, 신혈류량 등이 혈압상승에 대해 적응한 상태이지만 이러한 적응현상은 정상적인 혈압의 기준으로 볼 때 신장의 배설기능이 저하되어 있는 것이라고 하였다. 따라서 선천성 고혈압의 경우 신장의 혈관은 항상 수축상태를 유지하고 있기 때문에 약물과 같은 외적 요인에 의해 자극되었을 경우, 고혈압 그 자체가 신증을 심화시키는 요소로 작용할 수 있다고 하였다.^{21,25)}

본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 선천성 고혈압 흰쥐에 PAN을 투여하여 미세변화신증을 유도한 다음, 혈청 생화학적 분석법, 광학현미경적 방법 및 전자현미경적 방법들을 이용하여 미세변화신증에서 나타나는 사구체의 변화와 비타민 E가 미치는 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험군 설정

실험에 사용된 동물은 출생 8주된 선천성 고혈압 흰쥐 (spontaneously hypertensive rat; SHR)를 생명공학연구소 (대전)로부터 구입하여 실험동물용 고형사료 (삼양사)와 물을 충분히 공급하면서 실내온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 의 사육조건으로 1주일간 적응 사육시켜 외관상 건강하다고 판단되는 개체만을 선정하여 실험에 이용하였다. 실험군 설정은 정상군 16마리, PAN 투여군 40마리, 비타민 E 투여군 32마리, PAN+비타민 E 투여군

40마리로 구분하였다.

약물의 투여와 동물의 처치

PAN (6-dimethylaminopurine-3-amino-D-ribose, sigma)의 투여는 30 mg/kg을 주사용 생리식염수에 녹여 복강 내에 주사하였으며, 비타민 E 투여는 (\pm)- α -tocopherol acetate (sigma) 200 mg/kg의 양을 soybean oil에 녹여 경구 투여하였다. PAN+비타민 E 투여군에서는 PAN 및 비타민 E 투여군과 같은 방법으로 조성된 시약을 이용하였으며, 비타민 E 투여는 PAN 투여전 7일간 전처리하였고, PAN은 비타민 E 경구 투여 24시간 후 1회 복강주사 하였다. 정상군은 주사용 생리식염수를 PAN 투여량과 동량을 복강으로 주사하였다. 각 실험군은 PAN 투여 후 2, 4, 8 및 16일째 각각 처치하였다. 각 실험동물들은 처치 전 24시간 동안 식이를 중단시켰고, 에테르로 흡입 마취 후 체중을 측정된 다음, 복대동맥을 통해 혈액을 채취한 후, 신장을 적출하여 양측 신장을 합하여 무게를 측정하였다.

혈청 생화학적 검사

복대동맥으로부터 혈액을 채취한 다음 30분간 실온에 방치시킨 후, 3,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 자동 생화학 분석기 (Hitachi-747)를 사용하여 총단백질, 혈중 요소성 질소, 크레아티닌 함량을 측정하였다.

광학현미경적 관찰 방법

조직의 일반염색을 위하여 적출한 신장을 3~5 mm 두께로 잘라 10% 중성 포르말린에 충분히 고정하였다. 고정이 끝난 조직들을 흐르는 물에 담가 조직 내 고정액을 제거하였고, 알코올 농도 상승순으로 탈수과정을 거친 다음 파라핀에 포매하여 시료를 제작하였다. 제작된 시료를 박절기 (Model-45, Lipshaw)를 이용하여 4 μm 두께로 절편을 만든 다음, hematoxylin-eosin 염색하여 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다. 그리고 PAS 염색은 일반적인 조직 관찰을 위해 제작된 시료를 4 μm 두께로 절편을 만들어 탈파라핀, 함유시키고 periodic acid 용액에 10분간 반응시킨 다음, 수세 후 Schiff 용액에 다시 15분간 반응시켜 수세, 탈수, 봉입과정을 거쳐 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경적 관찰 방법

적출한 신장의 피질부분을 1 mm³ 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde (0.1M 인산염 완충액, pH 7.4)로 4℃에서 3시간 전고정하고, 인산염 완충액으로 충분히 세척한 다음, 1% OsO₄에 2시간 후고정하였다. 고정이 완료된 조직은 인산염 완충액으로 세척하여 50% 알코올에서부터 농도

상승순으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 epoxy 혼합물에 침투 및 포매한 다음 열중합시켜 시료를 제작하였다. 제작된 시료를 초박절편기 (Reichert Supernova)를 사용하여 1 μm 두께로 절편을 만든 다음, 1% toluidine blue 용액에 염색하고 관찰부위를 선정하여 60~70 nm 두께로 초박절하였다. 절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 염색시키고 가속전압 75 KV에서 투과전자현미경

Table 1. Rate of increase of body weight and kidney weight/body weight ratio

	Duration (Day)	Group			
		Control	PAN	Vitamin E	PAN+Vitamin E
Rate of increase of body wt.(%), kidney wt./body wt.(%)	2	2.79, 0.6920 (4)	2.54, 0.7090 (10)	3.01, 0.7436 (8)	2.88, 0.7295 (10)
	4	7.34, 0.7389 (4)	6.52, 0.7276 (10)	8.02, 0.7399 (8)	7.32, 0.7520 (10)
	8	12.12, 0.7347 (4)	8.30, 0.8140 (10)	12.70, 0.7103 (8)	11.45, 0.7697 (10)
	16	18.80, 0.7665 (4)	15.52, 0.8004 (10)	19.11, 0.7767 (8)	17.79, 0.7771 (10)

The numbers of determinations are shown in the parentheses

Table 2. Serum levels of total protein, blood urea nitrogen and creatinine in the experimental groups

Parameters	Day	Groups			
		Control	PAN	Vitamin E	PAN+Vitamin E
Total Protein (g/dl)	2	6.78±0.30 (4)	6.53±0.97 (10)	6.90±0.36 (8)	6.49±0.45 (10)
	4	6.97±0.29 (4)	5.37±0.72 (10)	6.86±0.74 (8)	5.67±0.19 (10)
	8	6.73±0.14 (4)	5.12±0.21 ^a (10)	6.86±0.12 (8)	5.59±0.03 (10)
	16	6.87±0.22 (4)	5.72±0.16 (10)	7.06±0.13 (8)	6.13±0.19 ^b (10)
Blood Urea Nitrogen (mg/dl)	2	21.7±5.21 (4)	22.7±3.33 (10)	20.5±6.00 (8)	21.6±1.83 (10)
	4	20.3±4.37 (4)	34.3±3.61 (10)	20.0±1.74 (8)	28.3±2.56 (10)
	8	20.4±2.10 (4)	46.7±4.11 ^c (10)	21.2±2.22 (8)	35.0±3.92 (10)
	16	22.3±3.62 (4)	44.5±2.09 (10)	21.7±3.16 (8)	31.6±4.22 ^d (10)
Creatinine (mg/dl)	2	0.46±0.09 (4)	0.41±0.11 (10)	0.44±0.12 (8)	0.43±0.09 (10)
	4	0.44±0.04 (4)	0.54±0.02 (10)	0.43±0.04 (8)	0.48±0.10 (10)
	8	0.45±0.07 (4)	0.77±0.11 ^e (10)	0.46±0.04 (8)	0.52±0.03 (10)
	16	0.48±0.06 (4)	0.65±0.12 (10)	0.47±0.07 (8)	0.49±0.03 ^f (10)

Each value is represented as mean±S.E.

a; p< 0.05, Control group at 8 days vs. PAN-treated group at 8 days

b; p< 0.05, PAN-treated group at 16 days vs. PAN+Vitamin E-treated group at 16 days

c; p< 0.05, Control group at 8 days vs. PAN-treated group at 8 days

d; p< 0.05, PAN-treated group at 16 days vs. PAN+Vitamin E-treated group at 16 days

e; p< 0.05, Control group at 8 days vs. PAN-treated group at 8 days

f; p< 0.05, PAN-treated group at 16 days vs. PAN+Vitamin E-treated group at 16 days

The numbers of determinations are shown in the parentheses

(H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

결 과

체중 및 신장의 무게

체중은 실험 기간에 따라 증가되었는데 PAN 투여군이 가장 낮은 증가율을 보였고, 비타민 E 투여군이 가장 높은 증가율을 보였다. 하지만 체중에 따른 신장의 비율에 있어서는 PAN 투여 8일째가 0.8140%, 16일째가 0.8004%로 가장 높게 나타났다 (Table 1).

혈청 생화학적 분석

혈청으로 분석한 총 단백질 함량, 혈중 요소성

질소 함량 그리고 크레아티닌의 함량 측정 결과는 Table 2와 같다.

혈청 내 총 단백질의 함량은 정상군과 비타민 E 투여군 모두에서 실험군간의 변화가 없었으나 PAN 투여군에서는 정상군과 비타민 E 투여군보다 낮게 나타났는데, 실험 8일째에는 정상군과 비교하여 감소되었고 ($p<0.05$), 실험 16일째는 PAN+비타민 E 투여군보다 감소되어 나타났다 ($p<0.05$). 혈중 요소성 질소의 함량은 정상군과 비타민 E 투여군의 경우 실험군간의 차이가 없었으나, PAN 투여군은 정상군과 비교하여 실험 8일째에서 증가되었고 ($p<0.05$), 실험 16일째에서 PAN+비타민 E 투여군에 비해 증가되었다 ($p<0.05$). 크레아티닌의 함량 역시 PAN 투여 8일째에서 정상군에

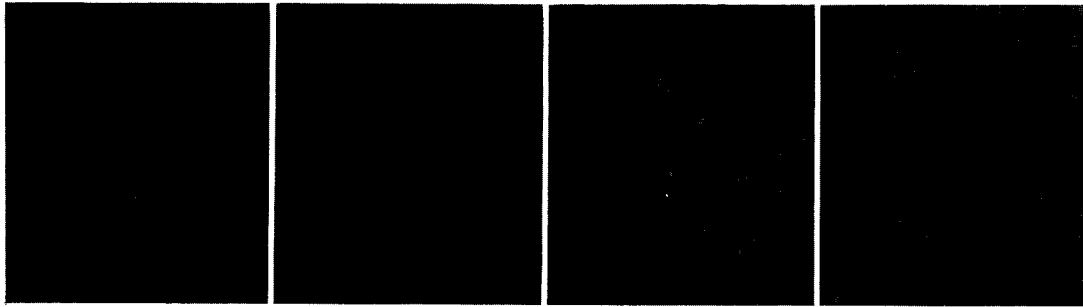


Fig. 1. Light micrographs of the glomerulus in renal tissue (H-E stain; *original mag.* $\times 200$): a) Control group, the renal glomerular structure is intact. b) PAN-treated group at 8 days, most of glomeruli adhered to bowman's capsules, and urinary space of each glomerulus is decreased compared with control group. c) PAN-treated group at 16 days, the urinary space is expanded compared with that at 8 days, nevertheless glomerulus adhered to bowman's capsules is partially observed. d) PAN+Vitamin E-treated group at 16 days, the tissue structure is similar to control group.

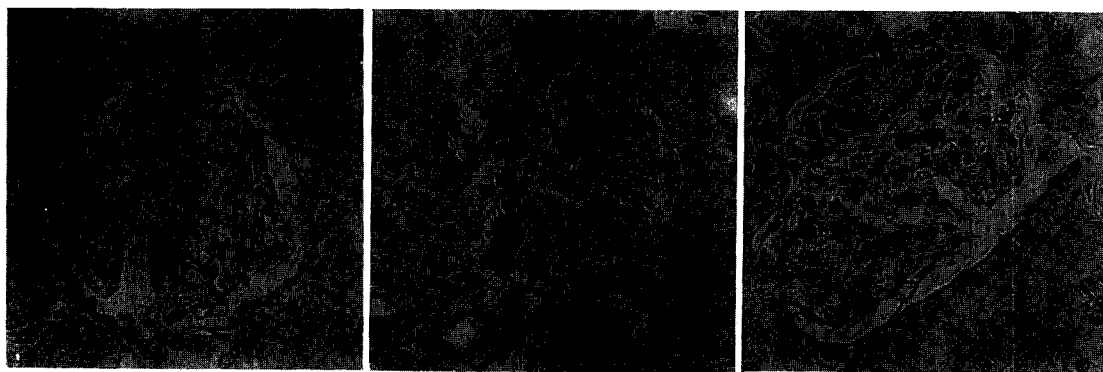


Fig. 2. Light micrographs of the glomerulus in renal tissue (PAS stain; *original mag.* $\times 200$): a) Control group, b) PAN-treated group at 4 days group, c) PAN+Vitamin E-treated group at 4 days group, the reaction with PAS in the PAN-treated tissue is stronger than the other groups.

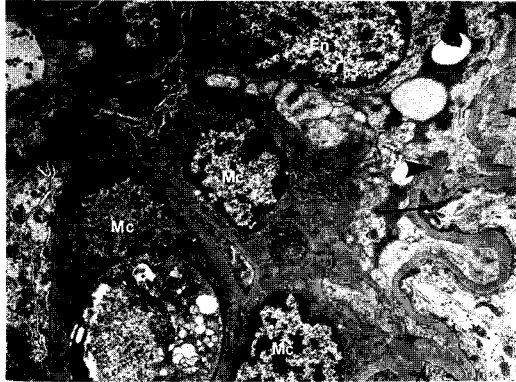


Fig. 3. Electron microscopic photograph of the glomerulus in PAN-treated group at 8 days (uranyl acetate and lead citrate stain; *original mag.* $\times 3,000$): Glomerular basal lamina is thicker than that of control group, the thicker basal lamina is partially formed protrusions (arrowheads). Mesangial cell is proliferated, and pedicles of podocyte are fused one another (arrows). En: endothelial cell, Mc: mesangial cell.

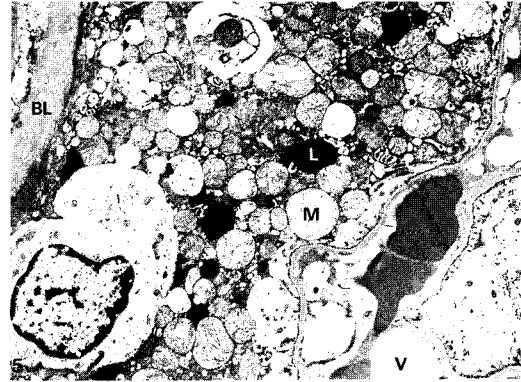


Fig. 5. Electron microscopic photograph of the glomerulus in PAN-treated group at 8 days (uranyl acetate and lead citrate stain; *original mag.* $\times 3,500$): Epithelial cells having a function of lining surface in the Bowman's capsule are thickened, they show a lot of cellular composition in their cytoplasm. BL: basal lamina of Bowman's capsule, M: mitochondria, L: lysosome, V: vacuole.

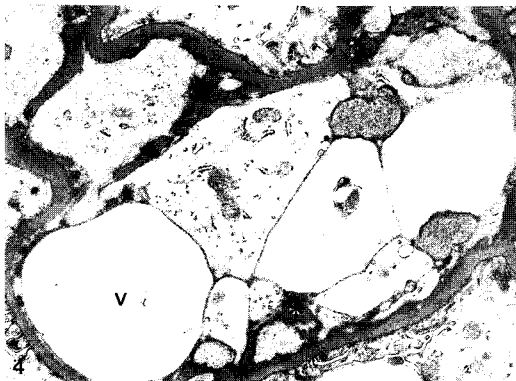


Fig. 4. Electron microscopic photograph of the glomerulus in PAN-treated group at 8 days (uranyl acetate and lead citrate stain; *original mag.* $\times 8,000$): Glomerular endothelial cell shows loss of pores and cytoplasmic edema. Basal lamina have branches and electro-dense deposits (*) in those both marginal surface. V: vacuoles.

비해 그 함량이 증가되었고 ($p < 0.05$), 16일째에서 PAN+비타민 E 투여군과 비교하여 증가되었다 ($p < 0.05$).

조직학적 변화

정상군의 사구체는 정상적인 구조로 요세관 공간 (urinary space)은 보우만 주머니 사이의 간격과 내강의 크기가 일정하였다 (Fig. 1a). PAN 투여군

4일째에서 사구체와 보우만 주머니의 유착이 국소적으로 관찰되기 시작하여, 실험 8일째 (Fig. 1b)에는 사구체가 비대해지고, 이로 인해 사구체와 보우만 주머니의 부분적인 유착이 형성되었다. 실험 16일째 (Fig. 1c)에서는 실험 8일째와 비교해 볼 때 사구체와 보우만 주머니의 유착현상이 드물게 관찰되었다. PAN+비타민 E 투여군은 실험 8일째에 사구체와 보우만 주머니의 부분적 유착이 관찰되었으나, 실험 16일째 (Fig. 1d)에서는 이러한 변화들이 거의 관찰되지 않았다.

PAS 염색 결과 PAN 투여군 4일째 (Fig. 2b)에서부터 사구체 내에서 강한 반응양상을 보였는데, 비타민 E의 투여 (Fig. 2c)로 반응양상이 현저히 감소되어 나타났다.

미세구조적 변화

PAN 투여 8일째에 사구체 족세포의 족돌기가 모두 기저막과 접한 부위에서 융합되어 있었고, 내피세포는 막의 소공 소실과 부종이 관찰되었다. 기저막은 불규칙하게 비후되어 있었고, 기저막 주위에는 부분적으로 전자밀도가 높은 물질의 침착과 기저막 자체의 돌출현상도 관찰되었으며 요세관 공간이 폐쇄된 부분도 관찰되었다 (Fig. 3, 4). 보우만 주머니의 편평세포 내에 사립체의 증식이 관찰되었으며, 편평형의 세포는 팽대되어 사구체 족세포와 서로 유착되어 요세관

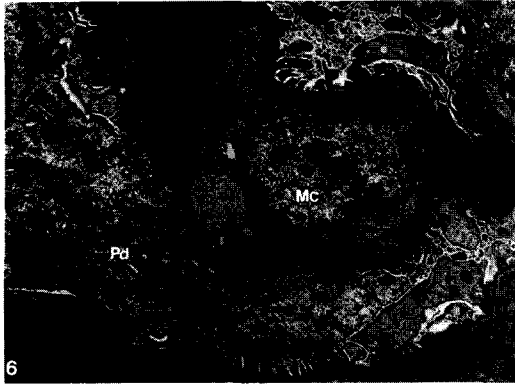


Fig. 6. Electron microscopic photograph of the glomerulus in PAN+Vitamin E-treated group at 8 days (uranyl acetate and lead citrate stain; original mag. $\times 4,000$): Pedicels of glomerular podocyte are fused one another with edema of podocyte, and the endothelial cell shows rare pores. Mc: mesangial cell, Pd: podocyte.

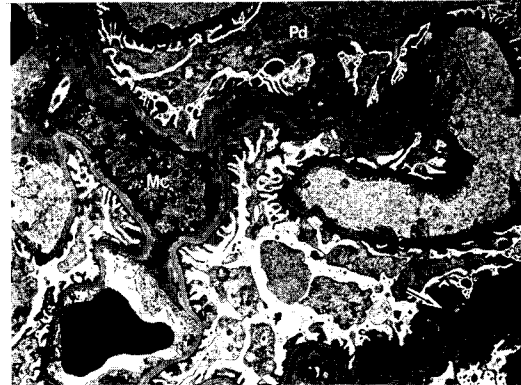


Fig. 7. Electron microscopic photograph of the glomerulus in PAN+Vitamin E-treated group at 16 days (uranyl acetate and lead citrate stain; original mag. $\times 4,000$): Electro-dense deposits (arrow) are noted in the thickened part of glomerular basal lamina. Mc: mesangial cell, Pd: podocyte.

공간을 구분할 수 없었다 (Fig. 5).

PAN+비타민 E 투여 8일째에 죽돌기의 융합이 부분적으로 관찰되었으나 PAN 투여 8일째와 비교해 볼 때 감소되었고, 내피세포 또한 부분적으로 소공이 소실된 부분이 관찰되었다. 기저막은 국소적으로 비후된 형태로 관찰되었으나 PAN 투여 8일째와 비교해 볼 때 현저히 감소되었다 (Fig. 6). 실험 16일째에서는 죽돌기가 비교적 일정한 간격을 유지하며 배열되어 있었으나 일부에서 융합된 곳이 관찰되었으며, 기저막은 전반적으로 정상적인 형태였으나 국소적 부위에서 비후된 형태를 보였다 (Fig. 7).

고 찰

본 실험에서는 선천성 고혈압 흰쥐를 이용하여 PAN의 투여로 유도된 미세변화신증에서 나타나는 사구체의 손상 양상과 변화 정도를 검토하고, 이에 대한 예방책의 일환으로 비타민 E를 투여하여 그 효과에 대해 알아보려고 하였다.

미세변화신증을 유발하기 위해서 본 실험에서는 3 mg/100 g의 양으로 PAN을 복강으로 1회 투여하였는데, 이런 투여량은 Ryan과 Karnovsky²⁴⁾가 사용한 15 mg/100 g의 양과 비교하여 볼 때 1/5 수준에 불과한 것이다. 이것은 Ryan과 Karnovsky는 정상혈압의 흰쥐를 사용하였고 본 실험에서는 선천성 고혈압 흰쥐를 사용하였기 때문에 여러

지며, 이러한 결과로 볼 때 고혈압 자체가 미세변화신증을 유발시키는 요인임을 암시하고 있는 것이다. 또한 정상혈압의 흰쥐에서는 본 실험에서보다 5배 많은 양의 PAN을 투여하고도 실험 2~3주째 손상이 최고에 이른다고 한 반면, 본 실험에서는 PAN 투여 후 8~16일째 사이에 최고에 이르렀는데, 이것은 Oh²⁰⁾의 보고로 볼 때 선천성 고혈압 상태 하에서의 내피세포가 혈관 수축과 같은 긴장도의 증가에 대해 매우 민감하게 반응하기 때문으로 생각되어 진다.

PAN은 지속적인 단백질 유출을 포함한 신기능의 손상을 야기시킨다고 하였는데²⁹⁾, 본 실험에서 나타난 체중 변화를 보면 비타민 E 투여군이 가장 높은 증가율을 보였고, PAN 투여군에서 가장 낮은 증가율을 보였다. 또한 체중에 대한 신장 무게의 비율에 있어서 PAN 투여 8일째에서 가장 높은 비율로 나타났는데, 이러한 결과는 낮은 체중 증가율에도 불구하고 사구체 세포의 증식과 신증에 의한 부종에 근거한 결과로 추정된다. 반면 PAN+비타민 E 투여군은 PAN 투여 8, 16일군과 비교해 볼 때 각각 체중 증가율은 높게 나타났고, 체중에 대한 신장 무게 비율은 낮게 나타나, 비타민 E의 전처리가 PAN에 의해 유도되는 신증을 억제시키는 효과가 있는 것으로 판단되었다. PAN 투여군 4일째부터 혈중 총 단백질 함량의 감소와 혈중 요소성 질소와 크레아티닌의 증가가 시작되어 8일째에 혈중 총 단백질이

최저치를, 혈중 요소성 질소와 크레아티닌이 최고치를 보였다. 혈중 단백질 함량의 저하는 요중 단백질 함량이 증가될 수 있음을 시사하는 것으로 PAN으로 인한 사구체 손상을 의미²³⁾하는 것이며, 본 실험의 미세구조의 변화에서 나타난 기저막을 주축으로 한 족돌기의 융합과 소실, 내피세포의 소공 소실의 결과로 설명될 수 있다. 또한 혈청 내 요소성 질소와 크레아티닌이 증가된 것은 세뇨관의 과대사로 인한 기능 장애²⁹⁾ 때문일 것으로 보고되고 있다. 하지만 PAN+비타민 E 투여군에서는 PAN 투여군과 비교해 볼 때 동일 실험 기간에 따라서도 증가율이나 감소율은 다소 경미하여, 비타민 E가 PAN에 의한 신장 손상에 대해 보호 효과가 있음을 보여주고 있다.

PAN 투여 4일째는 PAN 대사의 초기 단계로 미세변화신증의 증상들이 아주 국소적인 부위에서 나타나기 시작하였고, 실험 8일째에 이르러 형태학적 변화들이 가장 심각하게 나타났다. 가장 뚜렷하게 나타난 변화로는 기저막 위의 족돌기의 융합과 탈락이 관찰되었는데, 족세포의 탈락은 단백질 유출과 더불어 음이온이 다량 유출되는 것을 의미하고^{23,29)}, 족돌기의 융합은 사구체 기저막과 족세포의 틈새 격막에 존재하여 음이온 전하 장벽으로 작용하는 glycosaminoglycan의 주 성분인 proteoglycan이나 heparan sulfate와 같은 음이온 부위가 소실되어 단백뇨가 형성될 수 있음을 의미하는 것이다^{22,23)}. 그러나 이와는 상반된 주장으로 이러한 형태적 손상은 단지 단백뇨에 따른 이차적인 결과에 불과하다는 보고도 있어^{2,24,28)} 아직 논란의 여지는 남아 있다. 본 실험에서 나타난 내피세포의 소공 소실과 모세혈관의 폐쇄현상이 관찰되었는데, 소공 소실은 내피세포의 부종에 의한 것이며, 모세혈관의 폐쇄 또한 더욱 심해진 부종 때문일 것으로 판단된다¹⁷⁾. 그리고 PAS 염색에서 나타난 것과 일치되게 미세구조적으로 기저막의 불규칙한 비후와 기저막 내 다량의 침적물이 침착²⁹⁾되어 있는 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 불규칙하게 비후된 사구체 기저막 내에서 발견되는 침적물들은 면역복합체, 보체, 혈청 단백질, 한냉글로불린, 섬유소라고 하였고, 모세혈관, 내피세포 그리고 족세포에서 관찰되는 침적물들 또한 이와 유사한 성분이라고 하였다¹⁷⁾. 그리고 기저막의 돌출현상은 막성 전환으로, 기저막의 족세포 쪽 면을 따라 전자고밀도성 침착이 일어나 새로운 기저막성 물질이 형성되었기

때문이라고 설명되고 있다¹⁷⁾. 본 실험에서 나타난 결과와 같이 비타민 E를 전처리함으로써 PAN에 의한 사구체 손상은 감소되는 것으로 나타났는데, 이러한 과정은 여러 보고들을 종합해 볼 때 PAN에 의해 지질과산화가 촉진되고, 지질과산화에 의해 형성된 연쇄적 라디칼 생성기전에 의해 조직장애가 발생될 때^{1,27)}, 비타민 E가 활성산소기에 의한 지질과산화 반응과 연쇄적인 이차산물의 생성 반응을 차단시켜 조직 손상이 감소된 것으로 추측할 수 있다^{7,29,30)}.

결과적으로 고혈압은 미세변화신증을 가중시키는 요인으로 작용하며, 비타민 E는 PAN으로 유도된 사구체 손상에 있어서 혈청 내 단백질량의 증가, 혈청 내 크레아티닌과 요소성 질소 함유량의 감소를 유도하고, 사구체와 보우만 주머니의 유착, 사구체 족돌기의 융합과 소실, 내피세포의 소공 소실, 기저막의 불규칙한 비후, 돌출 및 분지현상과 같은 형태적 변화들을 억제시키는 효과가 큰 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Burton GW and Ingold KU (1989): Mechanism of antioxidant action: preventative and chain-breaking antioxidants. In: Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, Eds. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants. Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press*, 29-43.
- 2) Cohen AH, Mampase F and Zamboni LZ (1977): Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. An ultrastructural study. *Lab Invest*, **37**: 30-42.
- 3) Diamond JR and Karnovsky MJ (1986): Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol*, **122**: 481-487.
- 4) Diamond JR, Bonventre JV and Karnovsky MJ (1986): A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int*, **29**: 478-483.
- 5) Diamond JR, Ding G, Frye J and Diamond IP (1992): Glomerular macrophages and the mesangial proliferative response in the experimental nephrotic syndrome. *Am J Pathol*, **141**: 887-894.
- 6) Drukker A and Eddy AA (1998): Failure of an-

- tioxidant therapy to attenuate interstitial disease in rats with reversible nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, **9**: 243-251.
- 7) Endreffy E, Túri S, Lászik Z, Bereczki C and Kása K (1991): The effects of vitamin E on tissue oxidation in nephrotoxic (anti-glomerular basement membrane) nephritis. *Pediatr Nephrol*, **5**: 312-317.
 - 8) Frenk S, Antonowics L, Graig JM and Metcoff J (1955): Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Pro Soc Exp Biol Med*, **89**: 424-427.
 - 9) Garin EH and Richard GA (1984): Prostaglandin synthesis inhibitors and primary antibody response in experimental nephrotic syndrome. *Clin Immunol Immunopathol*, **30**: 129-133.
 - 10) Glasser RJ, Velosa JA and Michael AF (1977): Experimental model of focal sclerosis: I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest*, **36**: 519-526.
 - 11) Groggel GC, Hovingh P, Border WA and Linder A (1987): Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol*, **128**: 121-127.
 - 12) Grond J, Schilthuis MS, Koudstwal J and Elema JD (1982): Mesangial function and glomerular sclerosis in rats after unilateral nephrectomy. *Kidney Int*, **22**: 338-343.
 - 13) Grond J, Weening JJ and Elema JD (1984): Glomerular sclerosis in nephrotic rats. Comparison of the long-term effects of adriamycin and aminonucleoside. *Lab Invest*, **51**(3): 277-85.
 - 14) Gwinner W, Landmesser U, Brandes RP, Kubat B, Plasger J, Eberhard O, Koch KM and Olbright CJ (1997): Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*, **8**: 1722-1731.
 - 15) Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E and Eddy AA (1992): Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol*, **141**: 1381-1396.
 - 16) Kim MK and Lee HS (1993): Experimental study of the progressive glomerulosclerosis induced by long-term administration of puromycin aminonucleoside in rats. *Korean J Pathol*, **27**: 1-10.
 - 17) Kim YL (1989): 사구체성 신질환에 대한 병리학적 분류적용의 딜레마. *Medical Postgraduates*, **61**: 180-190.
 - 18) Lee HS, Jeong JY, Kim BD, Kim YS, Zhang YZ and Chung HK (1997): Dietary antioxidant inhibits lipoprotein and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, **51**: 1151-1159.
 - 19) Lelongt B, Makino H and Kanwar YS (1987): Status of glomerular proteoglycans in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int*, **31**: 1299-1310.
 - 20) Oh BH (1997): Pathophysiologic relationship of kidney and hypertension. *Medical Postgraduates*, **25**(6): 209-214.
 - 21) Oizumi K, Miyamoto M and Koike H (1994): Effects of dihydropyridine Ca blockers on the renal function in nephrotic spontaneously hypertensive rat (SHR). *Bio Pharm Bull*, **17**(3): 407-410.
 - 22) Rada JA and Carlson EC (1991): Anionic site and immunogold quantitation of heparan sulfate proteoglycans in glomerular basement membranes of puromycin aminonucleoside nephrotic rats. *The Anatomical Record*, **231**: 35-47.
 - 23) Ricardo SD, Bertram JF and Ryan GB (1994): Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside treated rats. *J Am Soc Nephrol*, **4**: 1974-1986.
 - 24) Ryan GB and Karnovsky MJ (1975): An ultrastructural study of the mechanisms of the proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int*, **8**: 219-232.
 - 25) Saito T, Sato H, Obara K, Yamakage K, Abe K, Furuyama T and Yoshinaga K (1990): Progression of experimental focal glomerulosclerosis in the spontaneously hypertensive rat. *J Lab Clin Med*, **115**: 165-173.
 - 26) Saito T, Sumithran E, Glasgow EF and Atkins RC (1987): The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of pro-tamine. *Kidney Int*, **32**: 691-699.

- 27) Slater TF (1984): Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, **222**: 1-15.
- 28) Sung SH (1996): The effects of cyclosporin A on minimal change nephrosis and focal segmental glomerulosclerosis induced by administration of puromycin aminonucleoside in rats. *Korean J Pathol*, **30**: 981-997.
- 29) Trachtman H, Schwob N, Maesaka J and Valderrama E (1995): Dietary vitamin E supplementation ameliorates renal injury in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, **5**: 1811-1819.
- 30) Washio M, Nanishi F, Okuda S, Onoyama K and Fujishima M (1994): Alpha tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron*, **68**: 347-352.
- 31) Whiteside CI, Cameron R, Munk S and Levy J (1993): Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol*, **142**: 1641-1653.

=Abstract=

**Effects of α -Tocopherol Acetate on Puromycin Aminonucleoside-Induced
Glomerular Injury in Spontaneously Hypertensive Rats**

Yoon Jeong Lee and Won-Hark Park[†]

Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan, Kyongbuk, 712-749

In order to study the effects of α -tocopherol acetate in glomerular injury, the minimal change nephrosis disease was induced by puromycin aminonucleoside (PAN) in spontaneously hypertensive rats, and we examined biochemical analysis in serum and morphological changes. The experimental animals were divided to control, PAN-treated (30 mg/kg, I.P.), vitamin E-treated (200 mg/kg, P.O.), and PAN+vitamin E-treated groups. After PAN injection, the rate of increase of body weight was lower than the other treatments. In addition, at 8 days after PAN injection, total protein content in serum was the lowest, whereas both blood urea nitrogen and serum creatinine contents were the highest in all experimental groups, which their changes of serum parameters were statistically significant. In morphological changes, the glomerular tissue at 8 days after PAN injection clearly showed obstruction of urinary space and proliferation of mesangial cells, and that loss and fusion of pedicles, vacuolization and edema of endothelial cells, and thickness of basal lamina were ultrastructurally showed in the glomerulus. Glomerular injury was significantly prevented by administration of vitamin E having an antioxidant effect. It suggested that the glomerular injury induced by PAN was accelerated by hypertension, and renal dysfunction might be induced by oxidative injury.

Key Words: Hypertension, Glomerular injury, Vitamin E

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 5(1): 75-84, June, 1999]

[†] Corresponding author