

Cyclophosphamide를 투여한 NOD 마우스의 신장에 대한 형태학적 연구

이 준섭·성재경

서울대학교 수의과대학

(1994년 8월 22일 접수)

Morphological studies on kidney in cyclophosphamide-treated NOD mice

Joon-sup Lee, Je-kyung Seong

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Aug 22, 1994)

Abstract : This study was carried out to investigate diabetic renal changes in cyclophosphamide(CY) treated non-obese diabetic(NOD) mice and to develop animal model of diabetic human nephropathy. The 8-week-old NOD and ICR mice were injected with cyclophosphamide intraperitoneally at 200mg/kg body weight and compared the chemical effects on these mice with the non-treated NOD and ICR mice respectively. The renal glomeruli in ICR, cyclophosphamide-treated ICR(ICR+CY), NOD and cyclophosphamide-treated NOD(NOD+CY) mice were observed by the light and electron microscopes.

The results obtained were summarized as follows ;

1. Spontaneous incidences of diabetes mellitus in NOD mice were significantly promoted by dosing with cyclophosphamide.
2. Glomerulohypertrophy, proliferation of mesangium, partial thickening of glomerular basement membrane, and partial fusion of pedicels of podocyte were observed in NOD mice and NOD+CY mice. These changes were not observed in both ICR mice and ICR+CY mice.
3. The diabetic nephropathy observed in NOD+CY mice was more severe than that of non-treated NOD mice.

Key words : NOD mouse, diabetes mellitus, renal glomerulus, cyclophosphamide

서 론

당뇨병은 인슐린의 상대적 또는 절대적 결핍으로 당대사에 장애를 초래하여 만성적이고 지속적인 고혈당 상태를 보이는 소모성 질환으로서 다양한 합병증을 동반한다. 당뇨병은 그 발생 원인과 병태 양상에 따라 몇 가지 유형으로 구분된다¹. 림프구의 체장소도 내 침윤으로 인슐린 분비 세포인 B 세포가 선택적으로 파괴되어 유발되는 인슐린 의존성인 제 1형 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus, ketosis-prone, juvenile type DM)과 인슐린을 분비하는 B 세포는 정상이나 말초 표적 장기에서 인슐린에 대한 저항성 증가로 유발되

이 연구는 서울대학교 발전기금 포털 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

는 인슐린 비의존성인 제 2형 당뇨병(noninsulin-dependent diabetes mellitus, non-ketosis-prone, adult type DM)으로 나눈다. 이외에도 체내 포도당 함량의 증가에 따른 효율적인 인슐린 분비가 이루어지지 못하는 당내성 이상(impaired glucose tolerance), 임신성 당뇨병(gestational diabetes) 및 갑상선 기능항진증(hyperthyroidism), Down 증후군 등 다른 질병의 증세의 일부로 당뇨를 보이는 이차성 당뇨병(secondary diabetes)이 있다^{1,2}.

Gepts et al³이 급성 당뇨병으로 사망한 환자의 혀장소도에 림프구가 침윤된 것을 보고한 이래 제 1형 당뇨병의 원인은 자가면역기전에 의한 혀장소도 B 세포의 선택적 파괴(insulitis)로 알려졌다^{4,5}. 림프구 침윤의 원인으로는 환자의 감수성과 이의 표현에 영향을 미치는 바이러스, 화학물질 등의 환경적인 요인 등이 알려져 있다^{4,6}.

이러한 당뇨병은 급성 및 만성의 여러 가지 합병증을 동반한다. 급성합병증은 제 1형 당뇨병에서 흔히 나타나며 인슐린 부족에 따른 지방분해 산물인 케톤체(ketone body; acetoacetate, β -hydroxybutyrate, acetone)의 과다 축적으로 생기는 당뇨병성 산혈증(diabetic ketoacidosis)과 치료되지 않은 노년층의 당뇨병인 경우에 혈청내 포도당 농도의 급격한 증가로 고산투압성 비케톤성 혼수(hyperosmolar nonketotic coma) 등을 일으킨다^{7,8}.

만성 합병증으로는 신장의 기능적 및 형태적인 변화를 보이는 당뇨병성 신증^{9,10}, 신경계의 피사와 기능 저하를 가져오는 당뇨병성 신경병변¹¹, 망막증을 특징으로 하는 당뇨병성 안질환¹² 등이 있다. 특히 당뇨병성 신증은 당뇨병으로 인한 주된 사망 원인이 되고 있으며, 사구체의 비대, 사구체 기저막의 비후, mesangium의 증식 및 죽세포 둘기의 부분적 유합과 Kimmelstiel-Wilson 소견으로 불리는 특징적인 결절성 사구체 경화 등의 형태학적인 변화와 알부민뇨(albuminuria)와 사구체 여과량(glomerular filtration rate)의 증가 등의 기능적인 변화도 수반한다^{9,10,13}.

근래에 이르기까지 당뇨병의 원인을 밝히고 치료를 목적으로 여러 가지 모델동물이 개발되었다. 자연적인 당뇨병 모델동물로는 NOD 마우스(non-obese diabetic mice)^{14,15}, BB 랫드¹⁶, Chinese 햄스터¹⁷, C57BL6/J-job/ob 마우스¹⁸, C57BL6/KsJ-db/db 마우스¹⁸, KK 마우스¹⁹, guinea pig²⁰ 등이 있으며 개, 고양이, 돼지, 원숭이류에서도 당뇨병의 발생 보고가 있다²¹.

인위적인 당뇨병 유발 약제로는 alloxan^{22,23}, streptozotocin(STZ)^{23,25} 등이 있으며 바이러스로 당뇨병

을 유발시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 보고된 바 있는데 encephalomyocarditis(EMC) 바이러스, Mengo 바이러스, Cosackie B 바이러스 등은 혀장소도 B 세포를 직접 파괴할 수 있는 것으로 알려졌고, Reo 바이러스, Rubella 바이러스 등은 혀장소도의 B 세포를 파괴하지는 않으나 자가면역기전에 따라 이차적으로 B 세포를 손상시키는 것으로 알려졌다^{6,22,24}.

이 중에서 제 1형 당뇨병의 모델동물로 널리 사용되는 NOD 마우스는 1980년 일본의 Makino와 Tochino¹⁴가 ICR 마우스 계통에서 유래된 백내장 다발 계열인 cataract prone subline(CTS) 마우스를 계대하던 중 다뇨와 급격한 체중저하, 고혈당치를 보이는 일련의 개체를 분리계대하여 얻은 것으로 본래의 CTS 마우스와는 별개의 것으로 확립된 계통이다. 생후 4주된 NOD 마우스의 혀장소도 내에는 림프구가 침윤되며 9-10주령이 되면 림프구 침윤이 절정에 달하는 것으로 알려졌다. 당뇨병은 생후 15 주경에 솟컷에서 30%, 암컷에서는 82%에서 증세가 나타난다^{14,15}.

당뇨병의 신장 합병증에 관한 동물 연구로는 주로 학제 투여에 의한 질환모델이 대부분으로 ϕ sterby et al²⁵과 Hägg²⁶은 alloxan으로 당뇨병을 유발시킨 랫드에서 사구체 기저막의 비후와 mesangium의 증식 등을 관찰하였고, Wechner과 Majorek²⁷은 기니픽에서, Wechner과 Petri²⁸는 랫드에서 STZ의 투여로 유발된 당뇨병성 신증에 대하여 관찰하였다. Yong과 Bleasel²⁹은 STZ으로 당뇨병이 유발된 Wistar 랫드의 신장에서 섬유소성 침착과 IgG의 침착은 있으나 보체 C3는 관찰되지 않았다고 보고하였다.

자연발증 동물모델을 이용한 연구로 Wechner et al³⁰은 KK 마우스에 나타나는 당뇨병성 사구체경화는 모세혈관 간세포의 증식에 기인한다고 주장하였고, Nakhooda et al³¹은 Wistar 랫드에서, Brown et al³²은 BB 랫드를 이용한 연구에서 사람에서 보이는 당뇨병성 신증의 형태학적 변화와 유사한 변화인 사구체 기저막의 비후, mesangium의 증식 및 죽돌기의 부분적 유합을 관찰하였다. Watanabe³³은 NOD 마우스에서 면역조직화학적 방법으로 사구체 기저막에 C3보체 및 IgG, IgA, IgM 등이 침착된 것을 관찰하였고, 사구체 기저막이 비후되는 군에서는 glycohemoglobin A1(HbA1)이 증가한다고 보고하였다. Marion과 Carlson³⁴은 자연적인 당뇨병 발증 rhesus 원숭이의 신장을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하여 죽돌기의 광범위한 유합이 있음을 보고하였다.

최근 제 1형 당뇨병의 원인을 자가면역기전에 의한 것으로 보고 이에 관한 연구가 진행되던 중 면역억제제

로 쓰이는 cyclophosphamide(CY)를 NOD 마우스에 투여하여 성별에 관계없이 90% 이상의 높은 당뇨병의 발현을 보인다는 것이 보고되었다³⁷. 그리고 CY는 당뇨병에 대한 감수성이 없는 다른 일반 계통의 마우스에서는 당뇨병을 유발시키지 못한다는 사실도 밝혀졌다. 그러나 CY는 사람의 신장에 유독하다는 임상적 연구 결과가 보고된 바 있고³⁸, 실험적으로 CY를 투여한 랙드의 세뇨관과 방광에서 병변을 관찰하였다는 보고도 있다^{39,40}.

CY를 NOD 마우스에 투여하면(CY+NOD) 다른 당뇨병 모델동물에 비하여 조기에 높은 비율의 당뇨병 발증 효과를 나타내며 alloxan, STZ 등의 화학제에 의한 당뇨병 유발모델에 비하여 유전적 요인이 중요한 원인으로 알려진 사람의 제 1형 당뇨병의 발증기전과 더욱 유사한 것으로 알려져 있다. 그러나 최근까지 CY로 당뇨병을 촉진한 NOD 마우스에서 당뇨병의 촉진 이외의 당뇨병의 합병증 혹은 CY 약물 자체가 체내의 다른 장기 및 조직에 미치는 영향에 대한 연구는 별로 이루어지지 않았다.

이에 연구자는 NOD 마우스에 CY를 투여하여 당뇨병의 촉진 효과를 확인하고, 유발되는 NOD 마우스의 당뇨병성 신증을 사람의 것과 비교하고 약물 자체에 의한 신사구체의 변화 유무를 조사하여 화학물질에 의한 당뇨병 모델보다 유전적으로 당뇨병에 대한 감수성이 있는 동물모델에서 그 자연적 발생 기전에 따른 효과적인 고율의 당뇨병 발증모델을 확립하기 위한 기초 연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 본 실험에 사용한 동물은 한림대학교 실험동물부에서 번식시킨 생후 8주된 ICR 계 암컷 마우스 20 마리와 NOD계 암컷 마우스 20 마리로써 이들을 CY를 투여하지 않은 ICR과 NOD, CY를 투여한 ICR+CY, NOD+CY 4개 군으로 나누어 각 군에 10마리씩을 배정하였다. 사육 및 실험 기간의 사육실 환경은 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대 습도 $50 \pm 10\%$ 를 유지하였고 12시간 인공조명하에서 마우스용 cage에 4마리씩 넣어서 사육하였다. 사료(신촌사료, 마우스용)와 식수는 수시로급여하였다.

약물투여 : CY 투여군에서는 cyclophosphamide monohydrate(CY)(Sigma Co)를 생리적 식염수에 용해하여 체중 kg 당 200 mg을 복강 내에 1회 주사한 후 2주에 동일한 방법으로 다시 1회 주사하였다³⁰. 대조군

에는 생리적 식염수를 복강 내로 주사하였다.

당분해능 및 혈당 측정과 체중 변화 측정 : 실험 기간 중 1주일 간격을 두어 안와정맥총에서 채혈하여 glucose-oxidase 방법으로 혈당량을 측정하였으며 체중 변화를 관찰하였다. 200 mg/dl 이상의 혈당치를 보이는 개체를 당뇨병이 발증된 것으로 인정하였으며 체중의 변화와 혈당치의 변화를 Student T-test($P<0.05$) 방법으로 통계 처리하였다.

광학현미경적 관찰 : 각 군에서 실험 시작 후 4, 6 및 8주에 3마리씩 경추 탈구로 도살시킨 다음 즉시 개복하여 신장은 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 에틸알콜 탈수과정을 거쳐 각기 5 μm 와 3 μm 두께의 파라핀 조직 절편을 제작하여 hematoxylin & eosin(H &E), Mallory's triple, periodic acid Schiff(PAS) 및 periodic acid methenamine silver(PAM) 염색을 하여 경검하였다. 신사구체의 변화 정도를 표시하기 위해서는 한 개체에서 20개의 사구체를 임의로 선정하여 이상이 보이지 않는 것은 negative로, 이상이 있는 것이 5개 이하인 것은 mild로, 10개 이하인 것은 moderate로 15개 이상인 것은 severe로 표시하였다.

전자현미경적 관찰 : 적출한 신장의 피질 부위를 1mm³이하로 세절하여 1% paraformaldehyde-1% glutaraldehyde 용액(0.1 M PB, pH 7.4, 4°C)에 3시간 전 고정한 후 0.1M phosphate buffer(pH 7.4, 4°C)로 5분간 3회 수세하여 2% osmium tetroxide에 2시간 후 고정하였다. 고정된 조직은 0.1M phosphate buffer로 5분간 3회 수세해서 일반적인 방법에 따라 에틸알콜 탈수과정을 거쳐 Araldite mixture에 포매하였다. 포매한 조직은 ultramicrotome(Reichert-Jung Co)을 써서 0.8 μm 두께로 박절편하였으며 0.5% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 초박절편을 위한 부위 선정에 사용하였다. 필요한 부위를 찾아 diamond knife를 사용하여 50-70nm 두께로 초박절편한 후 formvar 막을 입힌 grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(TEM Zeiss EM 109)으로 관찰하였다. 신사구체의 변화 정도를 표시하기 위해서는 한 개체에서 5개의 사구체를 임의로 선정하여 이상이 보이지 않는 것은 negative로, 이상이 있는 것이 2개 이하인 것은 mild로, 3개 이하인 것은 moderate로 4개 이상인 것은 severe로 표시하였다.

결 과

체중의 변화 : 실험시작 후 1주일 간격으로 체중 변

화를 측정하여, ICR군과 CY를 투여한 ICR+CY군을 비교한 결과 ICR+CY군이 다소 낮은 체중 증가치를 보였으나 두 군간의 유의성은 없었고 NOD군과 CY를 투여한 NOD+CY군에서는 당뇨 발생 개체수의 증가와 함께 체중이 증가하지 않고 실험 시작 시의 체중을 유지하였다(Fig 1).

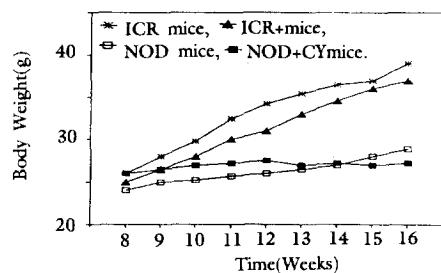


Fig 1. Body weight change of ICR and NOD female mice measured weekly after dosing with or without cyclophosphamide.

혈당치의 변화와 당뇨병의 발생 빈도 : ICR군과 ICR+CY군에서는 실험기간 동안 혈당치의 별다른 변화가 없었고 실험 종료시에는 각각 113.5mg/dl , 113.5mg/dl 를 보였다. NOD군과 NOD+CY군에서는 당뇨병의 발현 개체수의 증가와 더불어 각 군의 평균 혈당치도 증가하였다. 실험개시 후 6주에 NOD군에서는 264.1mg/dl , NOD+CY군에서는 388.9mg/dl 의 혈당치를 보였다(Table 1). 실험 종료시 NOD군에서는 60%, NOD+CY군에서는 90%의 누적발현율을 보였다 (Table 2).

광학 혈미경적 소견 : Hematoxylin & eosin으로 염색한 표본을 관찰한 결과 ICR군과 ICR+CY군에서는 실험 전 기간에 걸쳐 신소체에서 뚜렷한 Bowman's space를 관찰할 수 있었으며 모든 신소체가 정상으로 관찰되었다. NOD군에서는 실험개시 후 4주(생후 12주)에는 당뇨가 발현된 개체에서도 사구체에 뚜렷한 병증 소견이 없었으나 실험개시 후 8 주(생후 16주)에는 당뇨가 발현된 개체에서 사구체의 비대로 신소체 내의 Bowman's space가 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Blood glucose levels in ICR and NOD female mice dosed with or without cyclophosphamide

Group	2 wks		4 wks		6 wks		8 wks	
	No of animals	Blood glucose						
ICR	10	107.5 ± 2.8	10	109.6 ± 3.1	7	106.7 ± 4.9	4	$113.5 \pm 5.6^*$
ICR+CY	10	108.7 ± 2.2	10	110.2 ± 1.8	7	114.8 ± 11.7	4	113.5 ± 1.5
NOD	10	128.2 ± 13.4	10	166.5 ± 30.5	7	264.1 ± 46.8	4	315.3 ± 57.6
NOD+CY	10	129.6 ± 12.4	10	262.7 ± 43.3	7	388.9 ± 64.3	4	412.8 ± 86.2

* : mg/dl

Values are expressed as mean \pm SE.

Blood glucose levels are measured after 24 hours fasting.

Table 2. Cumulative incidence of diabetes mellitus in ICR and NOD female mice dosed with or without cyclophosphamide

Group	0 wk	2 wks	4 wks	6 wks	8 wks
ICR	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10*
ICR+CY	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
NOD	0/10	2/10	3/10	5/10	6/10
NOD+CY	0/10	1/10	5/10	8/10	9/10

* : Number of cumulative incidence of diabetes mellitus/Number of inspected mice.

Table 3. Morphological findings of the renal glomerulus of ICR and NOD female mice dosed with or without cyclophosphamide

Group	Thickening of GBM*			Fusion of pedicel			Proliferation of Mesangium		
	4 wks	6 wks	8 wks	4 wks	6 wks	8 wks	4 wks	6 wks	8 wks
ICR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ICR+CY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOD	+	+	++	-	+/-	+	+/-	+	++
NOD+CY	++	++	+++	-	++	+++	+	++	+++

* : Glomerular basement membrane.

- : negative, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe.

NOD+CY군에서는 NOD군에 비하여 같은 기간에 더욱 심한 사구체 비대가 관찰되었으며 실험 개시 후 8주에는 당뇨가 발증된 개체의 대부분의 신소체에서 Bowman's space가 소실된 것을 관찰할 수 있었다(Fig 2). 실험군(ICR+CY, NOD+CY)의 신장조직에서 결합조직이 증식하였는지를 알고자 Mallory's triple 염색방법으로 염색한 표본을 관찰하였으나, 대조군(ICR, NOD)에 비해서 차이가 없었다(Fig 3). PAS 염색으로 mesangium을 관찰한 결과 ICR군과 ICR+CY군에서는 실험 전 기간에 걸쳐 mesangium의 증식이 관찰되지 않았고(Fig 4), NOD군에서 당뇨병이 발증되지 않은 개체에서는 실험 전 기간 동안 mesangium의 증식을 관찰할 수 없었으나 실험 개시 후 8주에 당뇨병이 발증된 개체의 신소체에서 이들이 증식된 것을 관찰할 수 있었다(Fig 5). NOD+CY군에서도 당뇨병의 발증과 함께 mesangium의 증식이 시작되었으며 시간이 경과함에 따라 이들의 증식이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 6, Table 3).

PAM으로 처리한 결과 ICR군, ICR+CY군에서는 실험 기간 동안 사구체의 기저막이 정상으로 관찰되었으나 NOD군과 NOD+CY군에서는 검은색으로 보이는 사구체 기저막의 비후가 관찰되었으며(Fig 7) NOD+CY군의 사구체 전체에 걸쳐 광범위하게 관찰되었다(Fig 8).

전자현미경적 소견 : ICR군의 신장 사구체에서는 균일한 두께의 사구체 기저막과 이를 덮고 있는 족세포의 족돌기가 잘 관찰되었으며 사구체 모세혈관 사이에서 mesangium이 관찰되었다. Mesangium은 mesangial 세포와 기저막의 일부와 내피세포 사이의 간격을 메우고 있는 mesangial 기질로 이루어져 있었다. Mesangial 세

포의 핵은 대다수가 구형 혹은 타원형이었으며 세포질은 적게 관찰되었다. 기저막은 전자밀도가 높은 중간층과 다소 전자밀도가 낮은 내·외층 등 3층으로 구분되었다. 기저막의 내측은 내피세포로 덮여 있었으며 외측부는 족세포 돌기가 비교적 규칙적으로 덮고 있는 것이 관찰되었다. ICR+CY군의 경우에도 ICR군과 차이가 없는 정상적인 사구체 소견을 보였으며 균일한 두께의 사구체 기저막과 이를 덮고 있는 족세포 돌기가 명확히 구분되었다(Fig 9).

당뇨가 발증되지 않은 NOD군의 신장 사구체내에서 별다른 변화가 관찰되지 않았으나 당뇨가 발증된 개체에서는 실험 개시 후 4주에는 사구체 기저막의 부분적 비후와 미약한 mesangium의 비후가 보였고 다른 변화는 관찰되지 않았다. 실험 개시 후 8주에는 사구체 기저막의 부분적 증식, 일부 족세포 돌기의 부분적 유합과 mesangium의 증식이 관찰되었다(Table 3). NOD+CY군에서는 당뇨 발증과 함께 NOD군에 비하여 더욱 심한 사구체 기저막의 증식과 족세포 돌기의 부분적 유합 및 mesangium의 증식이 광범위하게 관찰되었다(Fig 10). 이러한 소견은 시간이 경과함에 따라 더욱 심하여져 사구체 기저막의 비후와 함께 이들의 추벽이 관찰되었다(Table 3).

사구체 모세혈관 기저막은 ICR군과 ICR+CY군에서는 3층으로 명확히 구분되었으나, NOD군과 NOD+CY군에서는 시간이 경과되면서 비후된 기저막과 족세포 돌기와의 유합에 따라 기저막의 층이 다소 불분명해졌다. 특히 NOD+CY군에서 기저막이 심하게 비후된 경우에는 전자밀도가 낮은 외측부위와의 융합과 이에 따른 외측 부위의 부분적인 소실이 관찰되었다(Fig 11).

고 칠

본 실험에서 ICR군과 ICR+CY군은 일정한 혈당치와 체중 증가를 보여 당뇨병이 발증되지 않은 것으로 믿어지며, NOD군에 비하여 NOD+CY군은 고혈당과 급격한 체중 감소를 보여 cyclophosphamide가 유전적으로 당뇨병에 소인이 있는 NOD 마우스에서 당뇨병의 촉진 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

사구체의 변화가 당뇨병이 발증되지 않은 NOD군 마우스나 ICR군, ICR+CY군에서는 보이지 않았고 당뇨병이 발증된 NOD군 마우스와 NOD+CY군 마우스에서 관찰된 것으로 보아 CY 자체의 사구체에 대한 독성은 없는 것으로 사료되며 NOD+CY군에서의 사구체 비대는 mesangium의 증식과 비례한 것으로 보아 mesangium의 증식으로 사구체가 비대된 것으로 믿어진다. 당뇨병이 발현된 NOD군 마우스와 NOD+CY군 마우스의 신장에서 관찰된 사구체의 비대, mesangium의 증식, 사구체 기저막의 비후, 족세포 돌기의 부분적 유합 등의 소견은 사람의 당뇨병성 신증에서도 나타나는데^{9,41} 그 원인은 확실히 밝혀지지 않았다. 당뇨성 신증의 경우 기저막의 증식에 따라 mesangium의 증식이 보인다고 하였다^{10,30,42}.

Wehner et al³⁰은 당뇨병의 모델동물인 KK 마우스에서 신사구체 병변을 관찰하였는데, 나이가 증가함에 따라 신사구체의 당뇨병성 병변은 더욱 심하여지며, 사람에서 보이는 당뇨병성 신장병변의 특이적 소견인 nodular glomerulosclerosis는 관찰되지 않았다고 보고하였다. Østerby et al²⁵과 Hägg²⁶은 alloxan을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 랫드에서 신사구체 기저막의 비후, mesangium의 증식, 사구체의 비대를 보고하였고 Wehner와 Petri²⁸, Yong와 Bleasel²⁹은 STZ를 투여한 랫드의 사구체에서 모세혈관 내피세포의 수는 감소하고, mesangial 세포는 증가한다고 보고하였으며 당뇨와 단백뇨를 보인다고 하였다. 본 실험에서 유전적 소인이 있는 자연발증 모델동물을 이용하여 연구한 결과와 사용한 화학적 유발물질을 이용한 결과와는 사구체 소견의 특별한 차이가 없는 것으로 사료된다.

Brown et al³²은 자연적인 당뇨병 발증모델동물인 BB 랫드의 신장을 조사하여 사구체 기저막의 현저한 비후를 관찰하였다고 보고하였으나 mesangium의 증식은 다른 실험동물모델과 달리 관찰되지 않았다고 하였는데, 본 실험의 결과 당뇨병이 발현된 NOD군과 NOD+CY군에서 mesangium의 증식을 보인 결과와 차이를 보이고 있다. 본 실험에서 조기에 일정한 비율(누적발증율 90%, 투여후 8주) 이상의 당뇨병을 발증시켜

당뇨병성 신증을 유발시켰는데 이는 Brown et al³²이 생후 6개월이 지난 BB 랫드에서 당뇨병성 신증을 관찰한 결과에 비하여 mesangium의 증식과 더불어 보다 조기에 안정된 수준의 당뇨병성 신증을 유발시킨 것으로 믿어진다.

Watanabe³³는 NOD 마우스에서 사구체 기저막의 비후와 초자양물질의 침착, mesangium의 증식과 IgG, IgA와 보체 성분의 기저막 침착을 보고하였다. 본 실험의 NOD군에서 당뇨병이 발증되지 않은 개체에서는 당뇨병성 신사구체 병변을 보이지 않았으나 당뇨병이 발증된 동물의 신사구체에서는 사람에서 보이는 것과 유사한 소견을 관찰할 수 있었다. 즉 mesangial 세포의 증식, mesangial matrix의 증식을 보였고, 사구체 기저막의 비후를 보였으나, 족세포 돌기의 부분적인 유합은 실험 전기간을 통하여 관찰되지 않았다. 사람에 있어서의 당뇨병성 신장병변의 특이한 병변인 Kimmelstiel-Wilson lesion은 다른 연구자들이 보고¹⁰한 것과 마찬가지로 본 실험에서는 관찰되지 않았다.

CY로 당뇨병이 촉진된 NOD+CY군에 있어서 NOD군에 비하여 더욱 심한 양상의 사구체 병변을 보였는데, 족세포 돌기의 유합도 실험 개시 후 6주(생후 14주)와 실험 개시 후 8주(생후 16주)에는 비후된 사구체 기저막과 함께 자주 관찰되었다. 이러한 차이는 ICR+CY군의 사구체에서는 병변이 관찰되지 않은 것으로 미루어 보아 CY 약물 자체에 의한 것이라기보다는 당뇨병의 발증 시기에 따른 것으로 사료되며, 실험 기간을 연장하여 관찰하게 되면 NOD군에서도 광범위하게 관찰될 것으로 생각된다. 이러한 부분적인 족돌기의 유합은 신장의 기능적인 여과막의 일부를 구성하고 있는 족세포가 포도당의 혈관내 침착으로 여과 작용이 저하됨에 따라 나타난다는 보고도 있다^{10,42}.

최근 당뇨병이 발증된 NOD 마우스에서 IgG, IgA, IgM 등의 항체들이 사구체 기저막과 mesangium에 침착된 것을 관찰한 연구 결과⁴³가 발표되었는데 Funabiki⁴⁴와 Suzuki⁴⁵가 사람에서 관찰한 연구 결과와 Abrass 와 Cohen⁴⁶이 STZ으로 인슐린 의존형 당뇨병을 유발시킨 랫드에서 보인 결과와 일치하여 당뇨병성 신증에 면역복합체가 연관이 있을 것으로 추측되고 있다.

CY에 의해서 당뇨병이 촉진된 NOD+CY군 마우스에서는 NOD군 마우스에 비하여 높은 혈당치를 보였으나, CY를 투여한 ICR+CY군 마우스와 CY를 투여하지 않은 ICR군 마우스의 혈당치는 별다른 변화를 보이지 않았다. ICR+CY군과 당뇨병이 발증되지 않은 NOD군에서 당뇨병성 신증으로 보이는 변화가 관찰되지 않은 것으로 보아 NOD+CY군의 사구체 변화는

CY 약물에 의한 직접적인 변화가 아니고 CY가 면역기전에 작용하여 2차적으로 오는 당뇨병에 의한 것으로 추측된다. 같은 시기에 사구체의 당뇨병성 형태 변화는 NOD+CY군이 NOD군 보다 심한 상태로 관찰되었다. 사람에서 보이는 당뇨병성 신장 병변과 같은 사구체 모세혈관 기저막의 부분적 비후, mesangium의 증식, 족세포 돌기의 부분적 유합, 사구체의 비대를 보여 CY에 의해 당뇨병이 촉진된 NOD+CY군 마우스는 사람의 당뇨병성 신증의 유용한 모델로 사용될 수 있으며 또한 이러한 현상들이 나타나는 정확한 기전에 대한 연구는 앞으로 계속되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

당뇨병이 유발된 마우스의 신사구체 병변을 형태학적으로 관찰하기 위하여 당뇨병의 유전적 소인을 가지고 있는 NOD 마우스와 일반계통의 ICR 마우스를 각각 2개군으로 나눈 다음 NOD 마우스 1개군과 ICR 마우스 1개군에는 cyclophosphamide(CY)를 체중 Kg당 200mg 씩을 복강내로 투여하고 남은 마우스(NOD,

ICR)에는 생리적 식염수를 투여하였다.

당뇨병이 유발된 마우스와 유발되지 않은 마우스의 신사구체를 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. CY는 NOD군에서는 당뇨병의 유발을 촉진시켰으나 ICR군에서는 당뇨병의 유발 효과가 나타나지 않았다.

2. CY를 투여한 NOD 마우스(NOD+CY)에서는 사구체 비대(glomerulohypertrophy), mesangium의 증식, 사구체 기저막의 부분적 비후, 족세포 돌기의 부분적 유합이 관찰되었으나 CY를 투여한 ICR 마우스(ICR+CY)의 신장에서는 이와 같은 병변이 관찰되지 않았다.

3. CY를 투여하지 않은 NOD군 마우스의 신장에서도 사구체 변화가 관찰되었으나 CY를 투여한 군에 비하여 그 정도가 미약하였다.

이상의 결과를 종합하면, CY를 투여한 NOD 마우스에서는 당뇨병의 유발이 촉진되었고 신사구체에 병변이 유발되었으나 CY를 투여한 ICR 마우스에서는 당뇨병이 유발되지 않았으며 신사구체에 병변도 유발되지 않았다.

Legends for figures

Fig 2. Kidney of the NOD+CY mouse(8 wks).

Glomerulohypertrophy is significant and most of Bowman's space is decreased(arrow). H&E stain. X 400.

Fig 3. Kidney of the NOD+CY mouse(8 wks).

The amount of connective tissue in the organ is not increased. Mallory's triple stain. X 400.

Fig 4. Kidney of the ICR+CY mouse(8 wks).

The mesangium is normal in appearance. PAS stain. X 400.

Fig 5. Kidney of the diabetic NOD mouse(8 wks).

Amount of the mesangium is increased(arrow head). PAS stain. X 400.

Fig 6. Kidney of the NOD+CY mouse(8 wks).

Amount of the mesangium is increased(arrow head). PAS stain. X 400.

Fig 7. Kidney of the NOD mouse(8 wks).

Thickness of the glomerular basement membrane is increased. periodic acid methenamine(PAM) stain. X 400.

Fig 8. Kidney of the NOD+CY mouse(8 wks).

Thickness of the glomerular basement membrane is significantly increased. periodic acid methenamine (PAM) stain. X 400.

Fig 9. Electron micrograph of renal glomerulus of the ICR+CY mouse(8 wks).

The glomerulus is normal in appearance. M : nucleus of the mesangial cell, PP: pedicel of podocyte. X 9,000.

Fig 10. Electron micrograph of renal glomerulus of the NOD mouse(8 wks).

Amount of the mesangium is increased and the glomerular basement membrane is partially thickened.

M : nucleus of the mesangial cell, PP : pedicel of podocyte,

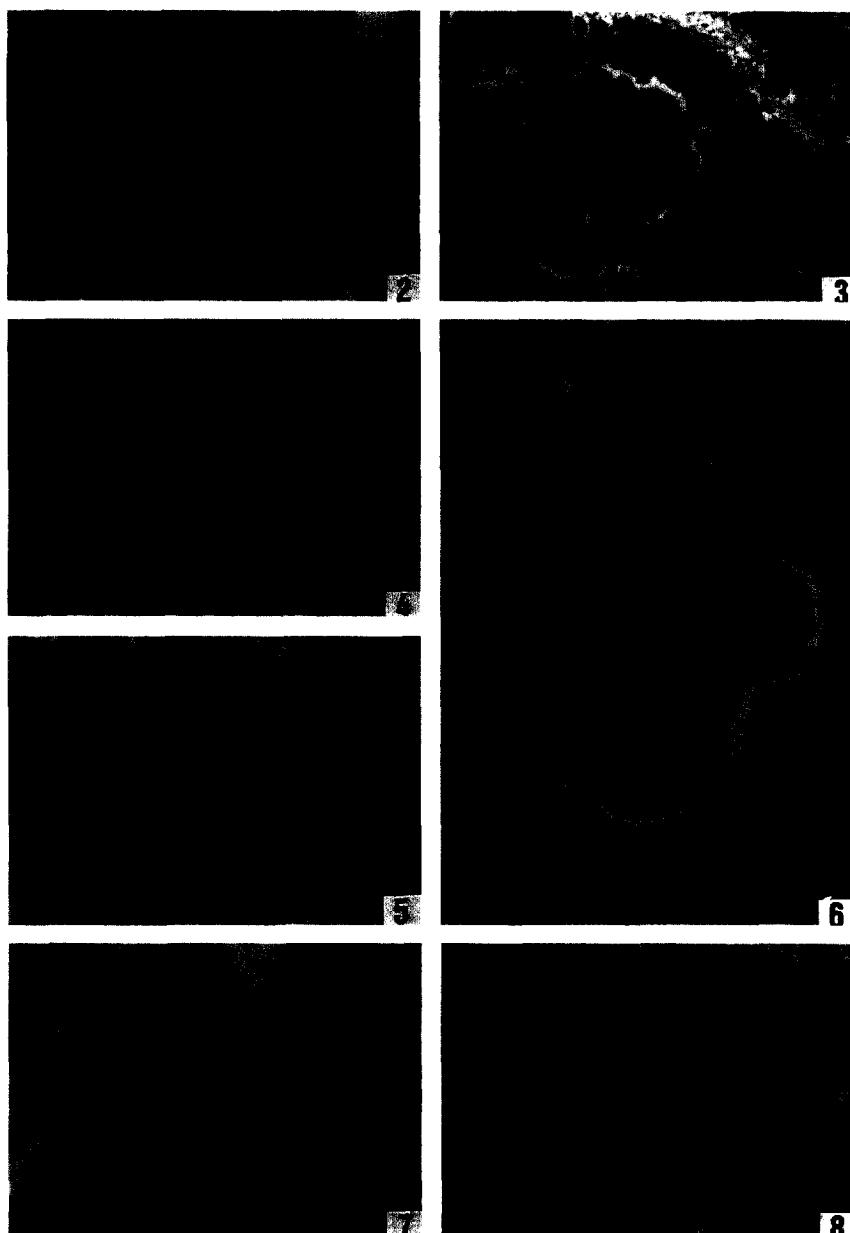
Arrow head : glomerular basement membrane. X 11,000.

Fig 11. Electron micrograph of renal glomerulus of the NOD+CY mouse(8 wks).

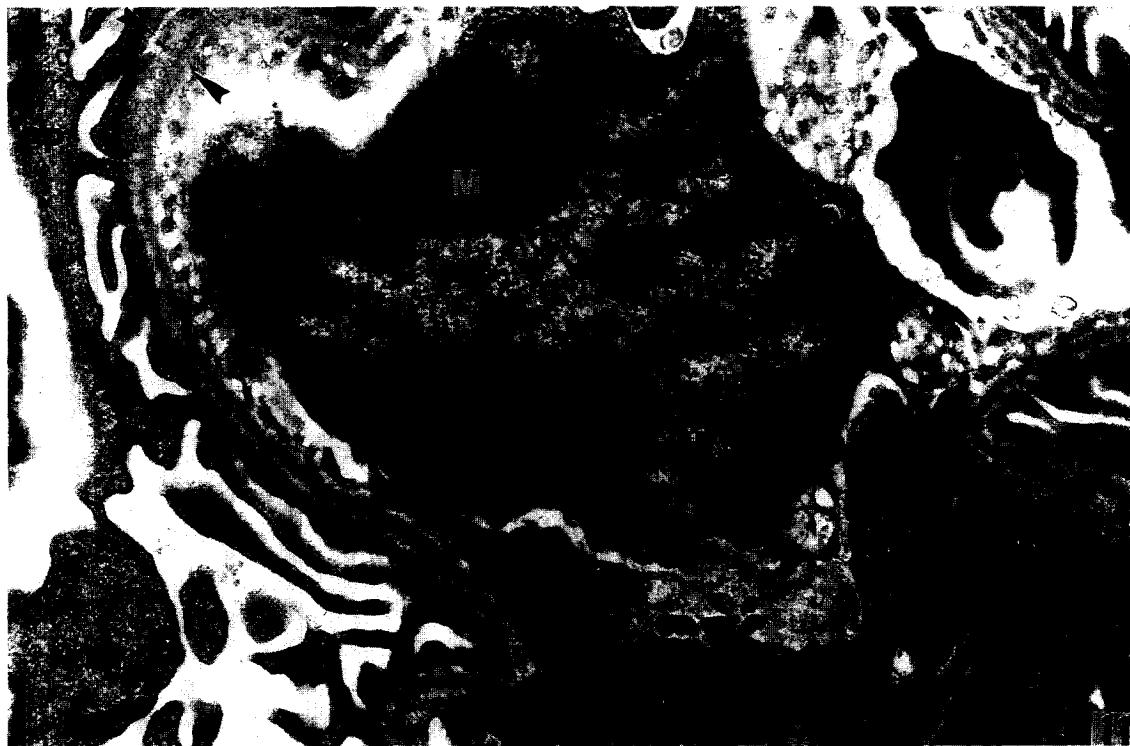
Amount of the mesangium is increased and the glomerular basement membrane is partially thickened. Pedicels of the podocyte are partially fused to the basement membrane.

M : nucleus of the mesangial cell, PP : pedicel of podocyte,

Arrow head : glomerular basement membrane. X 22,000.







참 고 문 헌

1. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
2. Volk BW, Wellman KF. Type II(idiopathic) diabetes(non-insulin dependent), In *The diabetic pancreas*. 2nd ed. Plenum Press, New York, 1986; 233-264.
3. Gepts W. Pathological anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14(10): 619-623.
4. Bach JF. Mechanisms of autoimmunity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 1-8.
5. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus, A chronic autoimmune disease. *N Eng J Med* 1986; 314(21): 1360-1368.
6. 이기업, 이홍규, 민현기 등. 자가 면역 실험동물 모델에서의 제 1형 당뇨병의 발생기전. *당뇨병* 1990; 12(2): 131-146.
7. Skyler JS. Complications of diabetes mellitus: relationship to metabolic dysfunction. *Diabetes Care* 1979; 2: 499-509.
8. Foster DW, McGarry JD. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N Eng J Med* 1983; 309: 159-169.
9. Kimmelstiel P, Osawa G, Beres J. Glomerular basement membrane in diabetics. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(1): 21-31.
10. Brown DM, Andres GA, Hostetter TH, et al. Kidney complications. *Diabetes* 1982; 31(Suppl. 1): 71-81.
11. Brown MR, Dyck PJ, McClearn GE, et al. Central and peripheral nervous system complications. *Diabetes* 1982; 31(Suppl. 1): 65-70.
12. Engerman RD, Finkelstein D, Aguirre G, et al. Ocular complications. *Diabetes* 1982; 31(Suppl. 1): 82-88.

13. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Renal histologic changes in diabetes mellitus. *Semi Nephrol* 1990; 10(3): 254-259.
14. Makino S, Tochino Y. The spontaneously non-obese diabetic mouse. *Exp Anim(Tokyo)* 1978; 27: 27-32.
15. Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL. Animal model of human disease. The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am J Pathol* 1987; 128(2): 380-383.
16. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, et al. The spontaneously diabetic Wistar rat(the "BB" rat). *Diabetologia* 1977; 14: 199-207.
17. Gerristen GC. The chinese hamster as a model for the study of diabetes mellitus. *Diabetes* 1982; 31: (Suppl. 1): 14-23.
18. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity in syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; 14: 141-148.
19. Nakamura M, Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia* 1967; 3: 212-221.
20. Lang CM, Munger BL, Rarp F. The guinea pig as an animal model of diabetes mellitus. *Lab Ani* 1977; 27(5): 789-805.
21. Meier H. Diabetes mellitus in animals. A review. *Diabetes* 1960; 9: 485-489.
22. Hunghes H, Ware LL, Young FG. Diabetogenic action of alloxan. *Lancet* 1944; 246: 148.
23. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulitis: a new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193: 415-417.
24. Craighead JE. Viral diabetes mellitus in man and experimental animals. *Am J Med* 1981; 70: 127-134.
25. Ø sterby R, Lundbaek K, Olsen TS, et al. Kidney lesions in rats with severe long term alloxan diabetes. III. Glomerular ultrastructure. *Lab Invest* 1967; 17(6): 675-692.
26. Hägg R. Renal lesions in rats with long-term alloxan diabetes. *Acta Path Microbiol Scand Section A* 1974; 82:199-210.
27. Wehner H, Majorek B. Early glomerular changes in streptozotocin diabetes in the guinea pig. *Virchow Archiv A Path Anat Histol* 1975; 368: 179:189.
28. Wehner H, Petri M. Glomerular alterations in experimental diabetes of the rat. *Path Res Pract* 1983; 176: 145-157.
29. Yong LCJ, Bleasel AF. Pathological changes in streptozotocin induced diabetes mellitus in the rat. *Exp Pathol* 1986; 30: 97-107.
30. Wehner H, Hohn D, Faix-Schade U, et al. Glomerular changes in mice with spontaneous hereditary diabetes. *Lab Invest* 1972; 27(3): 331-339.
31. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, et al. The spontaneous diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 1977; 26(2): 100-112.
32. Brown DM, Steffes MW, Thibert P, et al. Glomerular manifestations of diabetes in the BB rat. *Metabolism* 1983; 32(Suppl 1): 131-135.
33. Watanabe S. Histopathological and immunopathological studies on renal involvement in non-obese diabetic(NOD) mice. *JPN J Nephrol* 1989; 31: 11-19.
34. Marion MS, Carlson EC. Ultrastructural analyses of acellular glomerular basement membranes and mesangial matrix in a spontaneously diabetic rhesus monkey. *Acta Anat* 1989; 135: 119-128.
35. Evan AP, Mong SA, Gattone VH, et al. The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Renal physio Basel* 1984a; 7: 78-89.
36. Evan AP, Mong SA, Gattone VH, et al. The effect of alloxan, and alloxan-induced diabetes on the kidney. *Anat Rec* 1984b; 208: 33-47.
37. Harada M, Makino S. Promotion of spontaneous diabetes in non-diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia* 1984; 27: 604-606.
38. Lopes VM. Cyclophosphamide nephrotoxicity in man. *The Lancet* 1967; 13: 1060.
39. Philips FS, Sternberg SS, Cronin AP, et al. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. *Cancer Res* 1961; 21: 1577-1589.
40. Lavin P, Koss LG. Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. *Am J Path* 1971; 62(2): 169-180.
41. Osawa G, Kimmelstiel P, Seiling V. Thickness of glomerular basement membranes. *Am J Clin Path*

- 1966; 45(1): 7-20.
42. Steffes MW, Mauer SM. Diabetic glomerulopathy in man and experimental animal models. *Int Rev Exp Path* 1984; 26: 147-175.
43. Doi T, Hattori M, Agodoa LYC, et al. Glomerular lesions in non obese diabetic mouse: Before and after the onset of hyperglycemia. *Lab Invest* 1990; 63(2): 204-212.
44. Funabiki K. Immunohistochemical analysis of extracellular components on the glomerular sclerosis in patients with glomerulonephritis and diabetic nephropathy. *JPN J Nephrol* 1989; 31: 111-120.
45. Suzuki Y. Constituents of the extracellular matrices in diabetic glomerulosclerosis. *JPN J Nephrol* 1989; 31: 47-53.
46. Abrass CK, Cohen AH. Accelerated glomerulosclerosis in diabetic rats with immune complex injury. *Diabetes* 1987; 36: 1246-1253.