

면역억제제에 의한 신장독성 연구에서 조직 미세배열 분석 사용의 타당성 검토

연세대학교 의과대학 병리학교실¹, 소아청소년과학교실²

임범진¹ · 김지홍² · 정현주¹

Validation of Tissue Microarrays for the Study of Immunosuppressive Agent-induced Nephrotoxicity

Beom Jin Lim, M.D.¹, Ji Hong Kim, M.D.² and Hyeon Joo Jeong, M.D.¹

Departments of Pathology¹ and Pediatrics², Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Tissue microarray analysis (TMA) is a high-throughput method for histologic evaluation, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization using paraffin embedded tissue. Despite its high efficiency as an experimental tool, TMA is limited because it only contains a very small tissue fragment from each case. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the validity of TMA in a study of nephrotoxicity caused by immunosuppressants.

Methods: Male Sprague-Dawley rats were treated with vehicle (n=16), cyclosporine (n=23), and cyclosporine plus losartan (n=13) for a maximum of 7 weeks. After animal sacrifice, renal tissues were embedded in paraffin and processed into slides for microscopic examination using conventional methods and the TMA technique. Acute tubular injury, vascular hyaline change, and interstitial fibrosis were scored in both conventional and TMA slides. The number of interstitial macrophages was counted after ED-1 immunohistochemistry and the results also compared between conventional and TMA slides.

Results: The degree of acute tubular injury and interstitial fibrosis showed a significant agreement between conventional and TMA methods (κ value, 0.79 and 1.00, respectively). The number of interstitial macrophages counted in conventional and TMA slides showed a significant correlation as well ($r=0.934$, $P<0.001$). However, the degree of vascular hyaline changes showed less agreement between conventional and TMA methods (κ value, 0.40).

Conclusions: TMA is a useful and reliable method for the study of nephrotoxicity induced by immunosuppressive agents. TMA also reflects the findings of conventional methods, especially for acute and chronic tubular and interstitial changes.

Key Words: Tissue microarray analysis, Acute kidney injury, Tubulointerstitial fibrosis, Cyclosporine

중심 단어: 조직 미세배열 분석, 급성 신장 손상, 세뇨관-사이질 섬유화, 사이클로스포린

서 론

면역억제제에 의한 신장 손상 및 독성에 관해 동물실험을 통한 연구를 시행할 때는 신장 조직을 적출하여 대조군과 면역억제제 치료군 사이에 조직학적 소견 및 조

직에서의 신장 손상 관련 물질 발현을 비교하는 과정이 포함된다. 최근 분자생물학적 연구 기법이 많은 발전을 거듭하고 있는 것에 반하여 조직을 이용한 연구 기법은 광학현미경 검색과 면역조직화학 염색 이외에 특별히 새로운 연구 기법이 개발되지 않았고 주로 분자생물학적 연구 기법의 보조적 도구로서의 역할을 하고 있다.

Tissue microarray analysis (TMA) 혹은 multitissue array는 고식적인 방법에 따라 제작된 검체의 파라핀 블록으로부터 특수한 장비를 사용하여 0.6~3 mm 지름의 조직 코어를 채취하고 이를 코어 크기와 일치하는 홀을 미리 파 놓은 새로운 파라핀 블록에 옮겨 심어 하나의 파라핀 블록에 서로 다른 개체로부터 얻어진 조직을 모아 놓는 기법이다. 이렇게 제작된 새로운 파라핀 블록으로

책임저자 : 정현주, 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 의과대학 병리학교실, 120-749
Tel: 02-2228-1776, Fax: 02-362-0860
E-mail: jeong10@yuhs.ac

접수일 : 2013년 5월 8일, 심사일 : 2013년 6월 27일
게재승인일 : 2013년 6월 30일

본 연구는 대한이식학회 젊은연구자 연구비(2011)에 의해 이루어졌음.

부터 일반적인 마이크로톰 절편을 제작하여 면역조직화학염색이나 *in situ* hybridization (ISH) 등을 시행하면 코어 수만큼 다양한 기원의 조직에 대해 동시에 검사를 시행한 효과를 얻을 수 있는 고효율 검사법이다.

고식적 연구 방법에 비해 TMA를 사용한 연구는 짧은 시간에 대량의 개체를 대상으로 한 연구를 진행할 수 있고, 실험에 사용하는 시약의 양을 획기적으로 절감할 수 있으며, 짧은 시간 내에 실험을 진행하므로 실험 조건의 일관성을 유지하기 쉽다. 또한 주변 조직의 영향에 의한 위음성/위양성 발생이 최소화되고 결과 해석에 객관성이 증대된다는 추가적인 장점이 있다. 이와 같은 장점들로 인해 2000년 이후 TMA 이용이 가파르게 증가하여 지금은 면역조직화학염색 기법을 사용하는 연구의 약 10% 가량은 TMA를 사용해 이루어지고 있다(1).

그러나 TMA는 기본적으로 전체 조직이 동일한 세포로 구성되어 있는 종양성 병변에서 사용하는 것을 전제하여 개발된 기술로서, 다양한 세포와 조직으로 구성된 장기에서 이를 이용할 수 있는지 여부는 각각의 예에 대한 검증이 필요하다. 그러므로 면역억제 신장 독성을 비롯하여 신장의 기능성 질환 연구에서 TMA를 이용하려면 전체 조직의 극히 일부만을 사용하는 TMA가 전 조직의 변화를 대변할 수 있는지에 대한 연구가 선행되어야 한다.

본 연구에서는 백서에서 싸이클로스포린으로 신장 조직 손상을 유발하는 고전적 실험을 수행하고, 결과 분석은 고식적 조직 제작 방법과 TMA를 이용한 방법을 동시에 수행하여, TMA를 통해 얻은 결과가 고식적 실험 결과를 재현할 수 있는지 여부를 조사함으로써 향후 신장이식 및 각종 신장질환에 대한 연구에서의 활용 가능성을 검증하고자 한다.

재료 및 방법

1) 동물실험

생후 6주의 Sprague-Dawley 백서 수컷을 저염식이 (0.05%)로 사육하면서 각각의 실험군에 약물을 투여하였다. 실험군 분류는 다음과 같이 하였다. 1) 대조군: 올리브 오일(vehicle) 투여군(n=16), 2) 싸이클로스포린 투여군(n=23), 3) 싸이클로스포린+losartan (LSRT) 투여군(n=13). 싸이클로스포린은 올리브 오일(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 15 mg/mL로 용해시킨 후 15 mg/kg/day의 용량으로 피하주사하였다. LSRT는 음용수에 100 mg/L로 용해하여 30 mg/kg/day를 목표 농도로 식수에 섞어서 투여하였다. 올리브 오일과 약물의 투여 기간은 4~7주였다. 약물 투여 종료 후 백서를 희생시켜

신장을 적출하였다.

2) 조직표본 및 TMA 제작

적출한 신장을 포르말데히드 용액에 하룻밤 고정하고 표준적인 조직표본 제작 방법에 따라 파라핀 포매 블록을 제작하였다. 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 periodic acid-Schiff (PAS)와 trichrome 염색을 시행하였다. 면역조직화학염색을 시행할 절편을 추가로 박절한 후 남은 파라핀 포매 블록으로부터 TMA 제작을 위한 코어를 추출하였다. 코어 추출은 Quick-RAY (UNITMA Co., Ltd., Seoul, Korea) 키트 중 3 mm 직경의 니들을 사용하였다. 추출 부위는 현미경적 병변의 존재 유무를 고려하지 않은 채 결정하였으며, 조직의 중심부에 가장 가까운 피질-수질 경계(corticomedullary junction)에서 실험동물당 두 코어씩 추출하였다. 추출한 코어는 크기에 상응하는 3 mm, 6×5 수여 블록(recipient block)에 이식하였다. 수여 블록이 완성된 후 60°C 오븐에서 30분간 가열한 후 cold plate에서 식혀 코어와 수여 블록이 완전히 결합하도록 하였다. 제작한 TMA 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 마찬가지로 PAS와 trichrome 염색을 시행하였다.

3) 면역조직화학염색

고식적 파라핀 블록과 TMA 블록에서 박절한 조직을 사용해 ED-1 (Millipore, Billerica, MA, USA) 면역조직화학염색을 시행하였다. 박절한 조직을 자일렌과 순차적 농도의 에탄올에서 탈파라핀화 및 재함수 시킨 후 0.1% trypsin (37°C, 15분)과 microwave (750 W, 5분×4회)로 처리하여 항원을 노출시켰다. 1% 과산화수소수로 처리한 후 ED-1 일차항체(1:100)와 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. EnVision kit (DAKO, Copenhagen, Denmark)와 2-diaminobenzidine으로 발색하였다.

4) 조직학적 검색 및 분석

고식적 방법으로 제작한 슬라이드와 TMA로부터 제작한 슬라이드를 광학현미경으로 검색하여 분석하였다. TMA 슬라이드는 실험 동물당 두 코어씩 추출하여 제작하였으므로 추출된 코어 두 개를 모두 검색하였다. 급성 세뇨관 손상(acute tubular injury), 세동맥의 유리질 변성(hyaline change), 사이질 섬유화(interstitial fibrosis) 정도를 반정량 분석하였으며, 이 때 심각도의 등급은 이식신장 병리에 대한 Banff 분류법(1999 및 2007)의 방법을 응용하여 사용하였다(2,3). 급성 세뇨관 손상은 세뇨관 상피 세포의 공포화 및 확장, 탈락을 기준으로 판단하였으며 이런 변화의 정도를 (0, none; 1, <25%의 세뇨관에서 관찰; 2,

25~50%의 세뇨관에서 관찰; 3, >50%의 세뇨관에서 관찰)로 점수화하였다. 최종 결과는 0~1점을 경도 세뇨관 손상, 2~3점을 고도 세뇨관 손상으로 나누어 분석하였다. 세동맥의 유리질 변성은 (0, none; 1, 한 개의 세동맥에서 관찰, 혈관 원주의 일부 침범; 2, 한 개 이상의 세동맥, 혈관 원주의 일부 침범; 3, 수에 관계 없이 혈관의 전체 원주를 침범)으로 점수화하였다. 0~1점을 경도의 유리질 변성, 2~3점을 고도의 유리질 변성으로 나누었다. 사이질 섬유화 정도는 (0, <5%에서 섬유화 관찰; 1, 5~25%에서 관찰; 2, 25~50%에서 관찰; 3, >50%에서 섬유화 관찰)로 점수화하였다. 0~1점을 경도의 사이질 섬유화, 2~3점을 고도의 사이질 섬유화로 나누었다. 사이질의 대식세포 침윤 정도는 사이질에서 ED-1 면역조직화학염색에 양성 반응을 보인 세포의 수를 400배 고배율 (high power field, HPF)에서 계수하였다. 고식적 슬라이

드에서는 15 HPF를, TMA 슬라이드에서는 5 HPF를 계수하였으며 결과는 HPF 당 ED-1 양성 세포 수로 나타내었다.

통계 분석은 반정량적 척도로 측정한 항목은 chi-square method, κ 일치도 분석을 사용하였고, 세포의 수를 개수한 ED-1 세포 침윤 정도는 Wilcoxon signed rank test 및 Pearson 상관관계 분석을 시행하였다.

결 과

3 mm의 코어로 조직을 채취하여 TMA 한 슬라이드당 30개의 코어를 모을 수 있었다(Fig. 1). 한 증례당 2코어를 채취했으므로 15증례가 한 슬라이드 위에 수집된 것이다. 예비 검색 결과, 한 증례에서 추출된 두 코어는 유사한 조직학적 소견을 보였다.

고식적 슬라이드를 검색했을 때 세뇨관과 사이질의 병

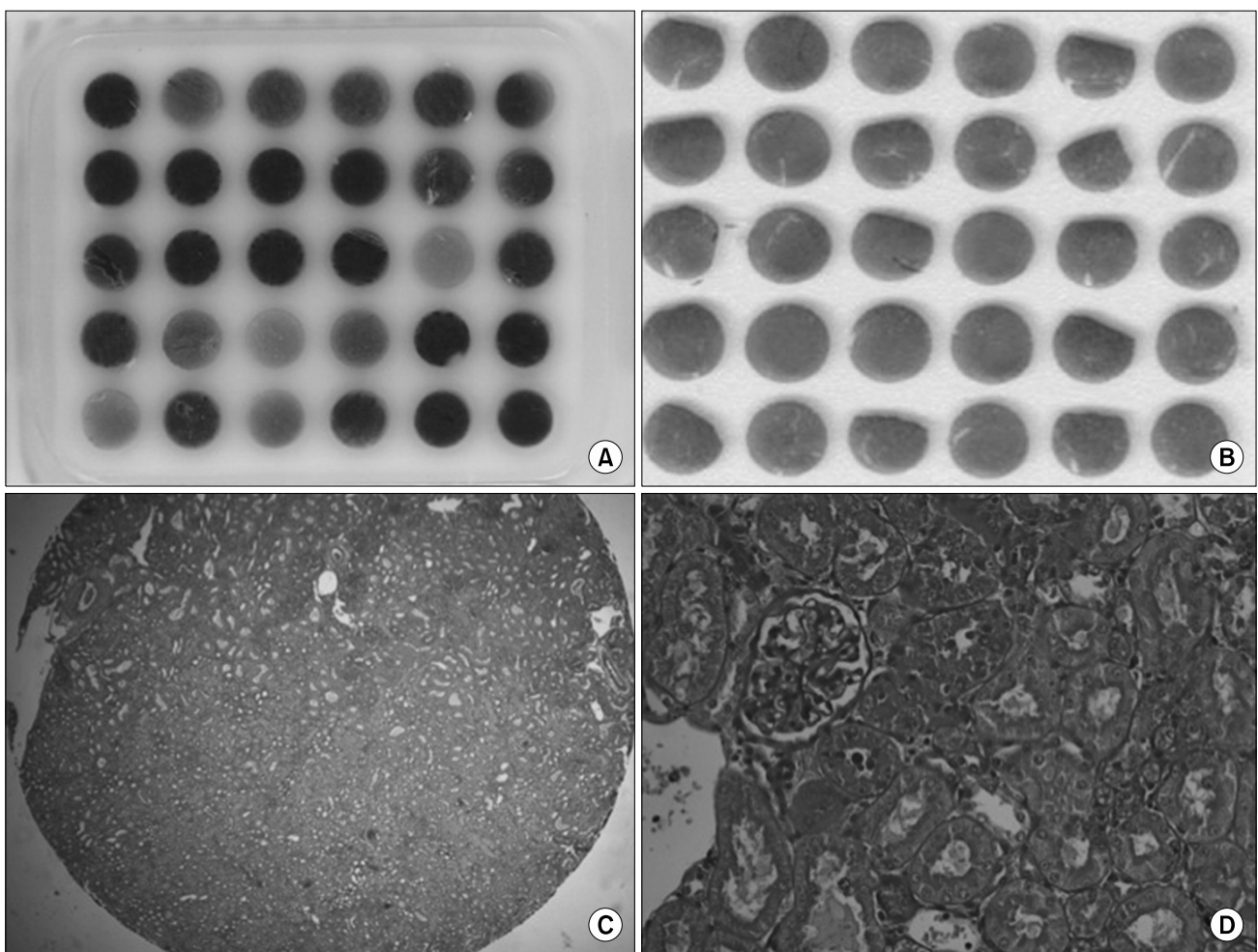


Fig. 1. A sample of tissue microarray (TMA). (A) 1:1 photography of a paraffin block and (B) a PAS-stained slide. Each TMA contained upto 30 tissue cores. Tissue cores were 3 mm in diameter and obtained from corticomedullary junction. Representative photograph of cores (C, $\times 40$; D, $\times 200$).

Table 1. Comparison of the severity of tubular injury between conventional and tissue microarray analysis slides

Tubular injury	Conventional slides		TMA slides		κ value
	Mild	Severe	Mild	Severe	
Vehicle	16 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	0.79
CsA	5 (21.7)	18 (78.3)	7 (30.4)	16 (69.6)	
CsA+LSRT	12 (92.3)	1 (7.7)	13 (100)	0 (0)	

Data are presented as number (%).

Abbreviations: TMA, tissue microarray analysis; CsA, cyclosporine; LSRT, losartan.

Table 2. Comparison of the severity of vascular hyaline change between conventional and tissue microarray analysis slides

Vascular hyaline change	Conventional slides		TMA slides		κ value
	Mild	Severe	Mild	Severe	
mVehicle	16 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	0.40
CsA	12 (52.2)	11 (47.8)	19 (82.6)	4 (17.4)	
CsA+LSRT	10 (76.9)	3 (23.1)	11 (84.6)	2 (15.4)	

Data are presented as number (%).

Abbreviations: TMA, tissue microarray analysis; CsA, cyclosporine; LSRT, losartan.

Table 3. Comparison of the degree of interstitial fibrosis between conventional and tissue microarray analysis slides

Interstitial fibrosis	Conventional slides		TMA slides		κ value
	Mild	Severe	Mild	Severe	
Vehicle	16 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	1.00
CsA	17 (73.9)	6 (26.1)	17 (73.9)	6 (26.1)	
CsA+LSRT	13 (100)	0 (0)	13 (100)	0 (0)	

Data are presented as number (%).

Abbreviations: TMA, tissue microarray analysis; CsA, cyclosporine; LSRT, losartan.

변은 정상과 병변 부위가 교대로 존재했지만 이 같은 양상이 조직 전체에 흩어져 있었기 때문에 미만성 변화로 판단하였다. 혈관 병변 역시 미만성으로 존재하기는 하였으나 병변의 수가 매우 적었다.

고식적 슬라이드를 이용하여 측정했을 때 대조군과 싸이클로스포린+LSRT 투여군에 비해 싸이클로스포린 투여군에서 고도의 급성 세뇨관 손상의 빈도가 의미 있게 증가하였다($P<0.001$) (Table 1). 세동맥의 유리질 변성도 싸이클로스포린 투여군에서 다른 두 군에 비해 고도 변화의 빈도가 증가하였다($P=0.004$) (Table 2). 사이질 섬유화 정도 역시 싸이클로스포린 투여군에서 다른 두 군에 비해 고도의 사이질 섬유화 빈도가 증가하였다($P=0.014$) (Table 3). 사이질 ED-1 양성 대식세포 침윤은 대조군에서 0.1 ± 0.1 cells/HPF, 싸이클로스포린 투여군

에서 17.4 ± 14.0 cells/HPF, 싸이클로스포린+LSRT 투여군에서 1.3 ± 2.0 cells/HPF로 관찰되었으며 대조군과 싸이클로스포린 투여군 사이($P<0.001$), 싸이클로스포린과 싸이클로스포린+LSRT 투여군 사이($P<0.001$)의 차이에서 통계적 의의가 확인되었다(Fig. 2).

TMA 슬라이드를 이용하여 상기 항목을 측정하였다. 급성 세뇨관 손상의 빈도는 고식적 슬라이드에서와 유사하게 싸이클로스포린 투여군에서 의미 있게 증가하였으며($P<0.001$) (Table 1) 사이질 섬유화 역시 고식적 슬라이드에서와 동일하게 싸이클로스포린 투여군에서 증가하는 결과를 보였다($P=0.014$) (Table 3). 그러나 세동맥 유리질 변성은 고식적 슬라이드에서와 달리 그룹간 의미 있는 차이가 없었다($P=0.218$) (Table 2). 사이질 ED-1 양성 세포의 침윤은 대조군에서 0.1 ± 0.1 cells/HPF, 싸이

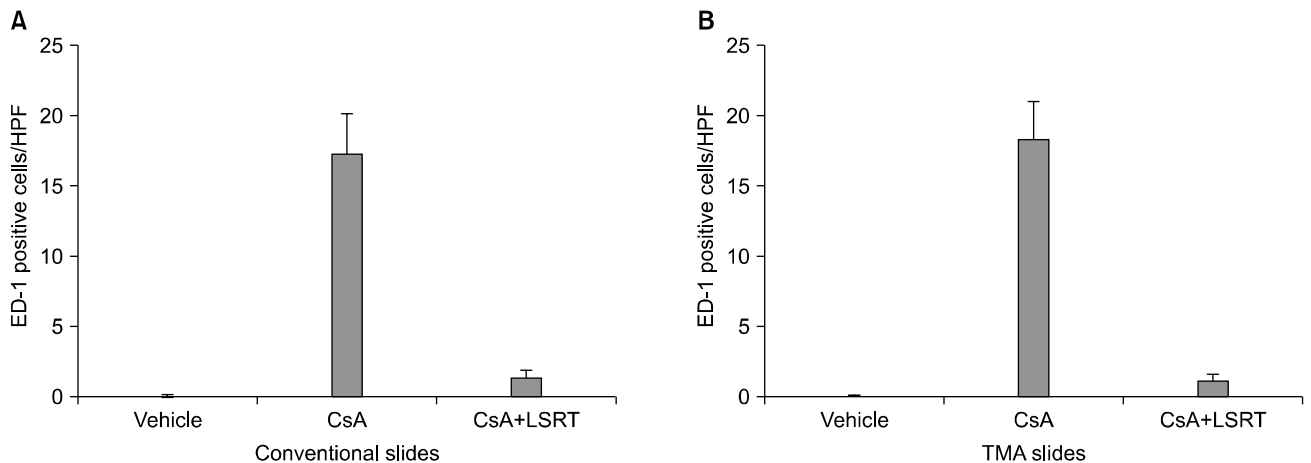


Fig. 2. ED-1 positive cell infiltration observed in conventional and tissue microarray analysis (TMA) slides. (A) In conventional slides, the number of ED-1 positive cells in interstitium was markedly increased after cyclosporine treatment, and remained in low level after cyclosporine and losartan combination treatment. (B) The result obtained from TMA slides showed same tendency in each group. Abbreviations: HPF, high power field; CsA, cyclosporine; LSRT, losartan.

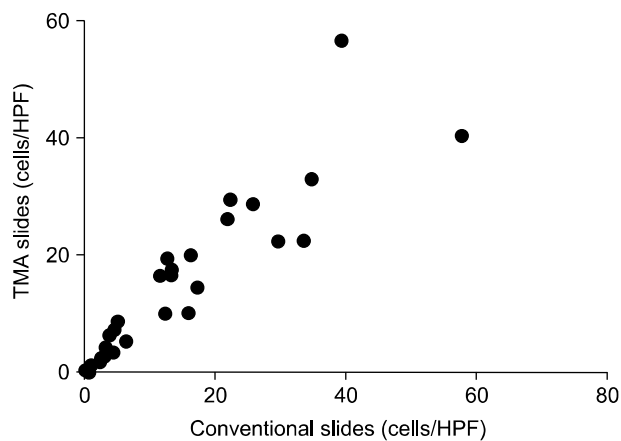


Fig. 3. Correlation of ED-1 positive cell counts obtained from conventional and tissue microarray analysis (TMA) slides. The number of ED-1 positive cells counted in conventional and TMA slides showed a significant correlation in each case ($\gamma=0.934$, $P<0.001$). Abbreviation: HPF, high power field.

클로스포린 투여군에서 18.3 ± 13.1 cells/HPF, 싸이클로스포린+LSRT 투여군에서 1.2 ± 1.7 cells/HPF였다. 고식적 슬라이드의 결과와 마찬가지로 대조군과 싸이클로스포린 투여군 사이($P<0.001$), 싸이클로스포린과 싸이클로스포린+LSRT 투여군 사이($P<0.001$)에 통계적으로 유의한 차이가 확인되었다(Fig. 2).

고식적 슬라이드와 TMA 슬라이드를 이용한 결과의 일치도를 분석하였다. 급성 세뇨관 손상에 대해서는 κ 값 0.79 ($P<0.001$), 95% 신뢰구간 0.603~0.966으로 현저한 일치도를 보였다. 세동맥 유리질 변성에 대해서는 κ 값

0.40 ($P<0.001$), 95% 신뢰구간 0.120~0.680으로 보통의 일치도를 보였으며, 사이질 섬유화에 대해서는 κ 값 1.00 ($P<0.001$)의 완전한 일치도를 보였다. 사이질 ED-1 양성 대식세포의 수에 대해 고식적 슬라이드와 TMA 슬라이드에서의 측정 값을 비교했을 때 두 방법 간의 측정치는 유의한 차이를 보이지 않았다($P=0.629$). 또한 두 방법에서 얻은 측정치 사이의 Pearson 상관계수는 0.934 ($P<0.001$)로서 강한 상관관계를 보이고 있었다(Fig. 3).

고 찰

일반적으로 짧은 시간에 대량의 개체를 대상으로 연구하기 때문에 실험의 조건을 동일하게 할 수 있고 시약과 재료를 획기적으로 절약할 수 있다는 점을 TMA의 장점으로 꼽는다(4,5). 이에 더하여 한 번 제작한 TMA 블록은 수십, 수백 차례의 박질이 가능하기 때문에 수많은 반복 실험이 가능하다는 것도 큰 장점이다. 예를 들어 TMA에 포함된 각 코어의 두께가 4 mm라 가정할 때 면역조직화학염색을 시행할 때 필요한 박질 절편의 두께는 4 μ m이므로 박질시 손실되는 조직이 없는 이상적인 조건 하에서는 이론상 1,000번의 반복 실험이 가능한 것이다. 또한 면역조직화학염색이나 ISH를 시행한 후 결과해석의 객관성이 증대된다는 장점도 있다. 고식적 슬라이드에서는 조직의 형태나 구성에 따라 간섭현상이나 변두리 효과(edge effect) 등이 흔히 나타나는 반면 TMA에서는 균일한 조직이 일정하게 배열되어 있기 때문에 이와 같은 위양성 요인이 배제될 수 있고 결과를 해석함에 있

어서도 주변 조직의 형태에 의해 생기는 선입견이 배제될 수 있기 때문이다.

그러나 TMA는 각각의 개체로부터 최소 크기의 조직만을 연구에 이용하므로 이를 통해 얻어진 결과가 전체를 대변한다고 볼 수 있는가에 대한 비판이 끊임없이 제기되어 왔다(5,6). 한 슬라이드에 많은 개체의 조직을 모을 수 있다는 장점이 있는 반면 TMA는 전체 병변 중 극히 일부만을 수집해 검사하는 것이기 때문에 대표성의 문제가 항상 대두된다. 전체 조직이 거의 동일한 세포로 구성되어 있는 종양성 병변의 경우 중심부 조직을 채취하면 그것이 전체를 반영할 가능성이 높지만 비종양성 질환의 경우는 반드시 그렇다고 말할 수 없다. 지금까지 TMA를 이용한 연구는 대부분 종양에서 특정 분자의 발현 여부를 검증하는 내용이었기 때문에 TMA에 포함된 작은 조직이 전체를 대표할 수 있다는 가설이 비교적 쉽게 받아들여졌다. 반면 비종양성, 기능성 질환에 대한 연구에 TMA를 이용하는 것이 타당한지 여부에 대해서는 지금까지 연구가 거의 이루어지지 않았다. 특히 신장질환의 연구에 TMA를 사용한 경우는 비종양성 병변에 대한 연구는 실험 동물의 정상 신장에서 각종 분자의 발현을 TMA로 측정해 봄으로써 신장질환 연구에 TMA를 사용하는 것이 타당하다는 결론을 얻은 연구 1건(7)과 타당성에 대해서는 언급하지 않은 채 사람 이식신장에서 C4d 발현 연구에 TMA를 사용한 연구 1건(8)이 존재할 뿐, 절대다수는 종양성 병변에 관한 연구이다. 신장의 각종 사구체 질환이나 이식신 거부반응, 약물 독성, 감염성 질환 등은 비종양성, 기능성 질환의 대표적 예로서 이들 질환에 대한 연구에 TMA를 이용하기 위해서는 그 타당성에 대한 검증 작업이 선행되어야 한다.

신장의 경우 사구체, 세뇨관, 혈관 등 각 구성 요소들이 질병의 병태생리에 복합적으로 기여하기 때문에 TMA를 이용해 연구할 경우 대표성의 문제에 더하여 이들 구성 요소들을 동시에 관찰할 수 있는지 여부도 중요하다. 코어의 크기를 작게 할 수록 한 개의 TMA 슬라이드 위에 모을 수 있는 증례의 수는 증가하겠지만 그만큼 관찰할 수 있는 구조가 적어진다. 본 연구에서 사용한 방법과 같이 3 mm의 코어로 피질-수질 경계에서 조직 코어를 채취할 경우 백서의 신장은 파라핀 포매 조직의 10% 정도가, 생쥐의 신장은 50% 이상이 TMA 코어 속에 포함되게 된다. 신장의 기능성 질환 연구에 있어서 3 mm 크기의 코어에 포함된 조직을 이용한 분석 결과가 고식적 슬라이드에서 얻은 결과를 어느 정도 반영할 수 있는지를 검토하는 것이 본 연구의 초점이었다.

싸이클로스포린으로 신독성을 유발하고 안지오텐신 수

용제 II 길항제인 LSRT으로 신독성의 진행을 억제하는 고전적인 동물 실험을 수행하였다. 세뇨관-사이질 병변 및 혈관 병변 모두 미만성으로 분포하였기 때문에 TMA를 적용하기에 적합한 경우로 판단하였다. 고식적 방법으로 제작한 슬라이드를 사용한 결과 분석에서는 예상한 바와 같이 급성 세뇨관 손상, 세동맥의 유리질 변화, 사이질의 섬유화 및 사이질의 대식세포 침윤은 싸이클로스포린 투여군에서 크게 증가하고 싸이클로스포린과 LSRT 병행 투여군에서 이보다 감소하는 결과를 보였다. 같은 항목을 TMA 슬라이드를 사용해 측정하고 고식적 슬라이드에서 얻은 결과를 대조군으로 삼아 변화의 양상과 진단 일치도를 분석하였다. 측정 항목에는 반정량적 분석 기법과 정량적 분석 기법이 모두 포함되도록 하였다.

반정량적 분석을 사용한 항목에서 급성 세뇨관 손상 및 사이질 섬유화는 고식적 슬라이드와 TMA 슬라이드에서 같은 변화 양상을 보였으며 각 증례에서의 진단 일치도 역시 높은 수준으로 나타났다. 그러나 세동맥 유리질 변성의 경우는 앞서의 두 항목에 비해 낮은 수준의 진단 일치도를 보였으며, TMA 슬라이드에서는 고식적 슬라이드에서의 결과와 달리 싸이클로스포린 치료 후에도 심각한 혈관 변화가 관찰되는 빈도가 높지 않아 싸이클로스포린 치료군과 싸이클로스포린, LSRT 병용 치료군 간에 의미 있는 차이가 인정되지 않았다. 사이질 대식세포 침윤은 정량적 분석으로 측정했으며 고식적 슬라이드와 TMA 슬라이드에서 동일한 양상으로 치료군 사이에 차이를 보여주었다. 상관계수를 구해 측정한 두 기법 간의 일치도 역시 강한 일치도를 보이는 것으로 나타났다. 이상을 종합하면 세뇨관과 사이질의 변화에 대한 반정량적 및 정량적 기법의 측정은 TMA 슬라이드를 이용하여도 고식적 슬라이드에서와 동일한 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

세뇨관과 사이질의 변화에 비하여 세동맥의 병변은 TMA 슬라이드를 이용한 측정을 신뢰할 수 없는 이유는 점수 산출의 기준으로부터 유추할 수 있다. 현재 이식신 거부반응 진단의 Banff 분류법은 침범당한 혈관의 수에 관계 없이 혈관의 전체 원주가 유리질 변화를 보이는 경우 가장 심각한 세동맥의 유리질 변성(3점)으로 판정하도록 규정하고 있다. 따라서 검색에 포함된 조직의 면적이 넓을 수록 심각한 세동맥 유리질 변성을 보이는 증례로 분류될 가능성이 커지며, 비록 혈관 병변이 미만성으로 분포하고 있기는 하지만 코어당 불과 3~4개의 세동맥을 포함할 수 있는 TMA 슬라이드에서는 3점에 해당하는 병변이 누락될 가능성이 있다. 실제로 본 연구에 포함된 조직 중 고식적 슬라이드에서 3점으로 판정된 것은 11예였

으나, 이 중 TMA 슬라이드에서도 똑같이 3점으로 판정된 것은 3예 뿐이었으며, 심지어 6예에서는 혈관 변성이 관찰되지 않아 0점으로 판정되었다. 이로 보아 세동맥 병변에 대한 연구는 TMA 슬라이드를 이용하는 것이 적절치 않음을 알 수 있다. 또한 비록 본 연구에서는 사구체의 변화에 대한 검토는 시행하지 않았으나 TMA에서는 코어 당 소수의 사구체만 포함된다는 점을 고려할 때 세동맥에서와 마찬가지로 제한점이 있을 것으로 예상된다.

파라핀 블록을 이용한 TMA 슬라이드는 면역조직화학 염색에 의한 단백 발현, ISH에 의한 단백 또는 mRNA 발현 측정에 이용할 수 있으나 RNA의 정량적 연구를 적용하기는 어렵다는 한계점이 있다. 그러므로 TMA를 단일 연구에서 최종 결과 분석용으로 사용하는 것보다는, 여러 질병들에 공통적인 병태생리(예를 들어 허혈-재관류 손상, 독성 세뇨관 손상 등) 기전에 의한 손상 모델을 미리 만들어 라이브러리화해 놓은 후에, 연관성이 있을 가능성이 있는 새로운 단백질들에 대해 스크리닝 하는데 사용하는 것이 더 효과적일 것으로 생각한다. 또한 신장의 기능성 질환 연구에서 TMA를 효과적으로 사용하기 위해서는 종양 연구에서 만들어진 것과 같은 TMA 활용의 가이드라인(9)을 개발하는 것이 필요하다.

결론

이상의 결과를 종합할 때 TMA는 신장의 세뇨관과 사구체 손상의 급성 또는 만성 병변을 대상으로 한 연구에서 고식적 슬라이드 제작 기법을 사용하여 시행한 연구와 동일한 결과를 얻을 수 있으며 따라서 신장 기능성 병변의 연구에 있어서 고효율 검사기법으로 사용될 수 있다. 그러나 사구체 질환 연구에 이용할 수 있는지에 대

해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol* 2008;26:5630-7.
- 2) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
- 3) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8:753-60.
- 4) Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. Tissue microarray: a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med* 2008;37:166-76.
- 5) Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol* 2008;18:89-97.
- 6) Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol* 2002;30:1365-72.
- 7) Zhang MZ, Su Y, Yao B, Zheng W, Decaestecker M, Harris RC. Assessing the application of tissue microarray technology to kidney research. *J Histochem Cytochem* 2010;58:413-20.
- 8) Mengel M, Chan S, Climenhaga J, Kushner YB, Regele H, Colvin RB, et al. Banff initiative for quality assurance in transplantation (BIFQUIT): reproducibility of C4d immunohistochemistry in kidney allografts. *Am J Transplant* 2013;13:1235-45.
- 9) Pinder SE, Brown JP, Gillett C, Purdie CA, Speirs V, Thompson AM, et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *J Clin Pathol* 2013;66: 169-77.