

# 아데닌 식이 유도 만성신부전증 마우스 모델의 장기적 생체 내 이광자 신장 영상화

최지은<sup>1</sup>, 최민선<sup>2</sup>, 이은영<sup>2</sup>, 김필한<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술원 의과학대학원

<sup>2</sup>순천향대학교 천안 병원 신장내과

<sup>3</sup>카이스트 나노과학기술대학원

## Longitudinal two-photon intravital renal imaging of the adenine induced chronic kidney disease mouse model

Jieun Choi<sup>1,2</sup>, Min-Sun Choi<sup>3,4</sup>, Eun Young Lee<sup>3,4,5</sup>, and Pilhan Kim<sup>1,2,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Medical Science and Engineering, KAIST, Daejeon, 34141, Korea

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University Cheonan Hospital, Cheonan, 31151, Korea

<sup>3</sup>Graduate School of Nanoscience and Technology, KAIST, Daejeon, 34141, Korea

\* pilhan.kim@kaist.ac.kr

### Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a gradual loss of kidney function over time. CKD is one of the common renal diseases with various causes. But, the detailed mechanisms for each cause are not well understood. Longitudinal repetitive observation of pathophysiological cellular-level changes during CKD progression in a live animal model is highly desired to investigate the underlying mechanism. In the study, using two-photon kidney intravital imaging, we longitudinally observed *in vivo* disease progression in an adenine-diet induced CKD mouse model over 30 days. Interestingly, we could successfully visualize the 2,8-dihydroxyadenine (DHA) crystal formation with a second-harmonics generation (SHG) signal, which was correlated with CKD progression assessed by blood urea nitrogen (BUN) and cystatin C levels. This result suggests that the label-free SHG imaging of DHA crystal can be potentially used as a new tool to monitor CKD progression or assess the efficacy of novel therapeutics *in vivo*.

### 1. 연구 배경

만성신부전증(Chronic Kidney Disease, CKD)은 고혈압, 심혈관 질환, 당뇨병, 유전적 변이 등 다양한 요인으로 인하여 전 세계적으로 유병률이 증가하고 있는 문제이다[1]. 네프론의 초기 손상으로 인한 기능 저하가 신장 손상을 심화시키기 때문에 초기 치료를 위한 분자 메커니즘에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 병인의 복잡성으로 질병에 대한 완전한 이해가 어려워 병의 진행에 따른 세포 수준 변화에 대한 연구가 필요하다.

대부분의 CKD 환자에서 심혈관 질환이 함께 나타나는데, 아데닌으로 CKD 마우스를 유도한 모델에서 두 가지 특징을 모두 확인할 수 있다[2]. 또한, 아데닌으로 유발된 CKD 마우스 모델은 상염색체 열성 질환인 adenine phosphoribosyl transferase 결핍 환자에서 나타나는 2,8-dihydroxyadenine (DHA) 결정이 함께 관찰된다[3]. 본 연구에서 이광자 현미경(Two-photon microscopy, TPM)을 이용하여 아데닌 식이로 유도된 CKD 마우스 모델 신장을 장기간 생체 내 영상화를 진행함으로써 질병 진행에 따른 생체 내 분자의 상호작용을 파악하였다. 특히, TPM의 2차 고조파(SHG) 신호는 DHA 결정을 형광 표지 없이 시각화를 가능하게 하여 추후 연구에도 큰 도움이 될 것이다.

### 2. 연구 방법

Custom-Built 이광자 현미경 시스템을 이용하여 형광 표지자 없이 신장의 세뇨관과 축적 되는 DHA 결정을 생체 내 실시간 영상화하였다(그림 1). 920nm 펄스 레이저가 폴리곤 미러와 갈바노미터를 통하여 각 X, Y축의 확장이 되어 고해상도 대물렌즈(CFI75 25XC W, Nikon)를 지나 신장을 반사한 후 502.5-626.0nm의 필터 범위에서 자가

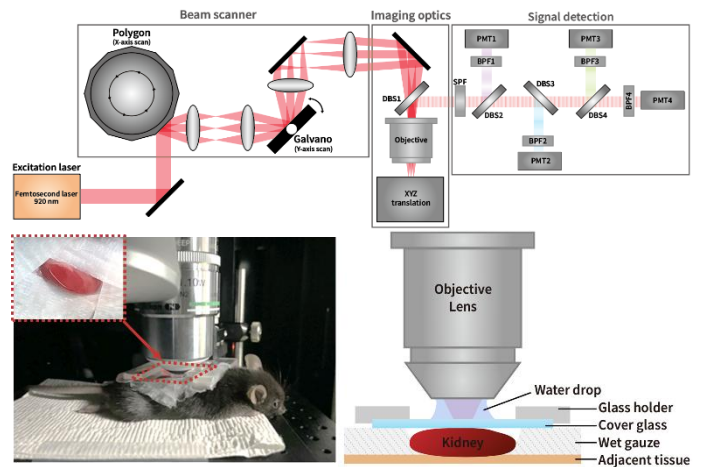


그림 1. 신장의 생체 내 이미지를 위한 Custom-built TPM 시스템의 도면 및 현미경 셋업 방법

형광을 검출하고 458.0-463.5nm 범위에서 SHG 신호를 검출하였다. 각 신호는 photomultiplier를 통해 디지털 신호로 변환되어 447 x 447 $\mu$ m의 이미지를 얻을 수 있었다.

CKD 유발을 위해 7주령의 C57BL/6N 수컷 마우스에 기존 사료와 0.2% 아데닌 식이 사료(Envigo, USA)를 30일 동안 섭취하도록 하여 각 normal diet (ND) 모델 adenine diet (AD) 모델을 유도하였다. 식이 시작 이후 0, 2, 5, 10, 20, 30일에 걸쳐 반복 TPM 이미징하여 질병의 진행 과정을 확인하였다. 축적되는 아데닌 결정의 부피는 그림 2와 같이 IMARIS 소프트웨어의 Surface 기능을 이용하여 정량화하였다.

마지막 30일에는 질병의 유발을 판단하기 위해 신장 기능 검사와 면역 조직 화학 염색을 수행 했다. 염색 후 세뇨관의

형태학적 변화는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

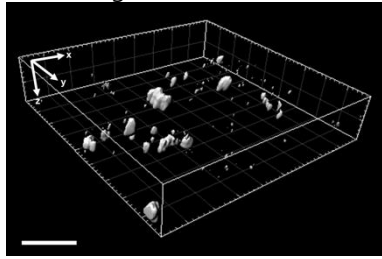


그림 2. IMARIS 소프트웨어를 이용한 결정 부피 분석

### 3. 연구 결과

본 실험에서는 Custom-Built TPM을 이용하여 살아있는 마우스의 신장을 실시간 영상화할 수 있었다. 마취한 마우스의 등 쪽 피부를 절개하여 좌측 신장을 피부 위로 드러내고, 그 위에 커버 글래스를 얹어 이미지화하였다. 이때, 마우스의 심장박동으로 인한 영상 떨림을 최소화하고, 신장의 구조를 방지하기 위해 젖은 거즈를 신장과 피부 사이에 덧대어 주었다. 그림 3. 과같이 NG2-DsRed, aldh111-GFP, CSF1R-GFP 및 CX3CR1-GFP 형질 전환 마우스 신장의 확대 이미지에서 세포 수준의 이미지가 검증되었다.

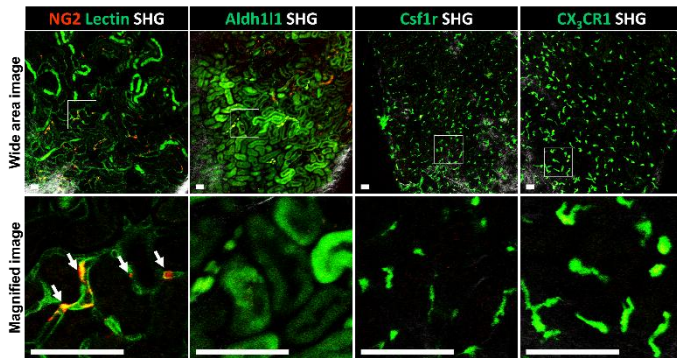
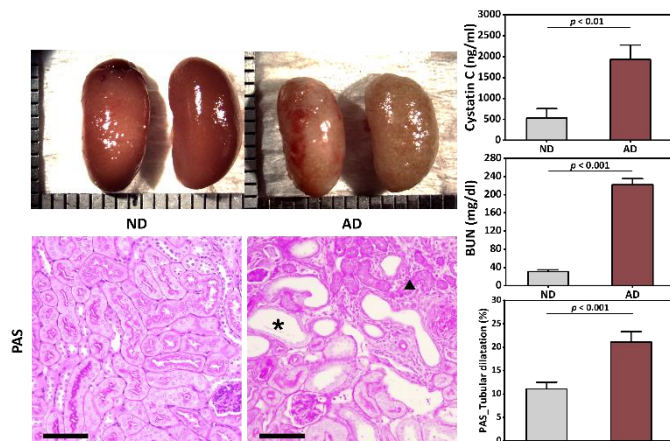


그림 3. 다양한 형질전환 마우스의 신장 이미지

아데닌 식이를 통해 마우스에 만성 신부전증을 성공적으로 유도하였다. 그림 4.의 30일 차 신장 형태 변화를 비교 해 보면 정상 신장(ND)에 비해 질병 유발(AD) 신장에서 붉은 채도가 줄어들고, 크기도 작아짐을 볼 수 있었다. 신장 기능 검사 결과 시스타틴C 수치는 694.9ng/ml에서 1926.9 ng/ml로 약 3배 증가하고, 혈액요소질소는 26.8mg/dl에서 221.5mg/dl로 약 8배 증가했다. Periodic acid-Schiff (PAS) 조직 염색 결과 AD 모델 세뇨관에서 위축, 팽창과 같은 형태학적 변화가 존재했다. 정량화 결과, 정상 모델은 11.10%의 세뇨관이 확장되었던 반면 질병 모델은 21.11%로 세뇨관이 약 2배 확장되어 CKD의 발달이 확인되었다.

그림 5.는 2광자 현미경을 이용하여 4주에 걸쳐 세포 수준의 AD-CKD 마우스 신장의 반복적 이미지 결과이다. 실시간 생체 내 z-stack 이미지를 3차원으로 변환하였다. 세뇨관은 자가형광을 통해, 결정은 SHG 신호를 통해 외부 물질의 주입 없이 성공적으로 CKD 진행을 모니터링 할 수 있었다. 시간이 지남에 따라 질병 마우스 신장에서 세뇨관

그림 4. 30일차 신장의 형태학적 비교 및 신장기능 검사 결과



위축의 증가와 2,8-DHA 결정의 축적이 나타났다. 더 자세한 분석을 위해 결정의 체적 비율을 정량화하여 각 시간 포인트에서의 그 변화를 확인 해 보았다. 신장 기능검사와 유사하게 질병이 진행됨에 따라 결정이 정비례하게 축적하는 상관관계를 보여주었다.

본 연구 결과와 같이 생체 내에서 신장 질환 진행을 모니터링하기 위해 이광자 현미경을 새로운 기술로 사용한다면 아데닌 뿐만 아니라 모든 유형의 CKD 모델에서 신장 질환을 모니터링 할 수 있을 것이다. 이것은 질병의 진행과 병리학적 기전에 대해 새로운 지식을 제공할 수 있다. 질병에 대한 깊은 이해는 CKD의 빠른 진단과 치료에 대한 개선으로 이어진다. 이광자 현미경을 사용한 생체 내

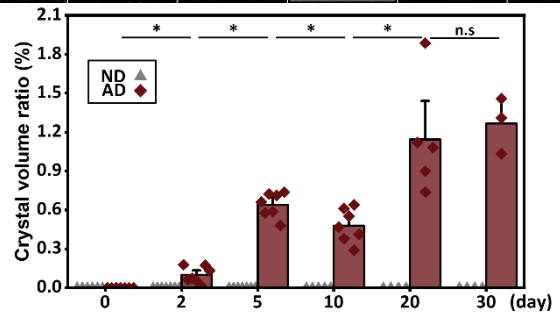
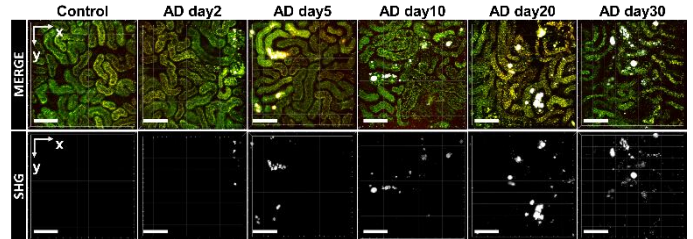


그림 5. 2광자 현미경을 이용한 시간에 따른 CKD 신장 생체 내 이미지 변화

영상화는 전임상 연구에서 신장 질환에 대한 이해를 크게 높일 수 있을 것이다.

### 4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (NRF-2020R1A2C3005694)

### 5.참고 문헌

- [1] Lv, J.C. and L.X. Zhang. "Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease." *Adv Exp Med Biol* 1165: p. 3-15, 2019
- [2] Diwan, V., L. Brown, and G.C. Gobe, "Adenine-induced chronic kidney disease in rats." *Nephrology (Carlton)*, 23(1): p. 5-11, 2018
- [3] Ali, B.H., et al., "New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: comparison with rats." *J Pharmacol Toxicol Methods*, 68(3): p. 384-93, 2013