

CsA가 사구체내 내피세포의 von Willebrand factor 발현에 미치는 영향

울산의대 내과

박 수 길

장기이식분야에서 있어서 Cyclosporin A(CsA)는 매우 효과있는 면역억제제로서 CsA 사용이후 급성거부반응의 발생빈도가 감소하였으며, 이식신의 생존율에도 호전을 가져올 수 있었다. 한편 CsA 사용에 동반되는 문제점으로 신독성이 있으며, 이는 신장 기능에 변화를 가져올 수 있는 중요한 문제이다. CsA의 신독성은 세뇨관의 상피세포와 사구체와 소동맥의 내피세포 손상으로 대별할 수 있으며, 내피세포의 손상은 thromboxane, endothelin 등의 cytokine의 생성과 미세혈전(microthrombi)의 생성이라고 말할 수 있다. 한편 미세혈관벽을 구성하고 있는 내피세포의 성질을 규명하기 위한 연구는 세포배양방법상의 어려움으로 인하여 아직 우리나라에서 발전되고 있지 못하고 있다.

이에 본 연구자들은 미세혈관 내피세포의 한가지인 사람의 사구체 내피세포를 실험실내에서 세포배양을 시도한 후 CsA의 농도변화에 따른 내피세포 손상의 한 지표이며 미세혈전 생성에 크게 기여할 것으로 생각되는 von Willebrand factor(vWf)의 변화를 ELISA 법을 이용하여 측정하였다.

사람의 사구체 내피세포의 배양을 위하여 신장암으로 신장의 적출이 필요하였던 환자의 신장에서 정상조직을 약 5-10g 정도 잘라내어 체질법(sieving method)에 따라서 사구체를 분리하였다. 메산지움 세포 배양과는 달리 내피세포의 배양을 위해서는 전체 사구체(whole glomeruli)가 아닌 사구체 조직파편(glomerular debri)이 필요하였으며 소의 시상하부(hypothalamus)에서 분리한 endothelial cell growth factor(ECGF, 200 μ g/ml)와 fibronectin(100 μ g/ml), heparin(100 μ g/ml) 등이 세포의 지속적인 성장을 위하여 필요하였으며 상피세포의 오염을 방지하기 위하여 puromycin(10 μ g/ml)을 24 시간 동안 반응시켰다. 분리배양된 내피세포는 세포의 모양과 vWf에 핵주위 세포질이 균일하게 염색되는 면역조직화학적 검사로 확인하였다. CsA가 사구체내 내피세포의 vWf 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 배양된 내피세포를 24 well에 분주한 후 confluent하게 지란 다음 Sandoz에서 기증받은 CsA를 ethanol에 녹인 후 0, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M의 농도로 반응시켰으며 Cremophor EL를 CsA 제제비율과 동일한 농도로 내피세포와 반응시켰다. 반응 1시간후 배양액 상층액 0.8ml을 모아서 냉동건조시킨 후 증류수 200 μ l에 녹인 다음 Asserachrom vWf test kit을 사용하여 vWf의 농도를 측정하였다. 실험결과를 보면 ethanol에 녹인 CsA 농도에 따른 vWf의 발현은 100%, 99.9 \pm 0.7%, 99.1 \pm 2.9%, 106.3 \pm 21.5%(0, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 평균 \pm 표준오차, n=2)로

아무런 변화도 관찰되지 않았으며, cremophor 농도에 따른 vWf의 발현은 100%, $104.0 \pm 8.6\%$, $117.6 \pm 9.5\%$, $121.3 \pm 12.2\%$ (0, 0.1uM, 1uM, 10uM, 평균 \pm 표준오차, n=3)로서 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 내피세포를 thrombin(1IU), histamine(10^{-4} M)과 같이 반응시킨 실험결과와 동일하였다.

이상의 실험결과로서 사구체내 내피세포가 실험실내에서 배양된 후 vWf 발현은 생체내 혈장(plasma)과는 달리 매우 적다는 것을 알 수 있었으며, CsA보다는 CsA 용매제인 Cremophor EL에 대해 좀 더 의미있는 반응을 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다.