D11

혈액투석개시후 단핵구세포 배양 상청액에의한 인근위세뇨관 상피세포에서의 Fas 유전자 발현양상에 관한 연구

조상경, 윤종우, 한상엽, 이소영, 강영선, 차대룡, 조원용, 김형규
고려대학교 의과대학 내과학 교실, 신장병연구소

서론:혈액투석은 복막투석보다 더 급격한 잔여신기능의 감소를 보인다. 이는 병리적으로 잔존 네프론의 사구체 및 세뇨관간질의 경화, 위축의 진행과 관계되며 투석막의 생체부적합성등이 원인으로 거론되고 있다. 그중 활성화된 단핵구로부터 생성되는 Interleukin-1β 및 Tumor necrosis factor-α등은 염증성 싸이토카인으로 직접적 또는 이차적 세포손상을 일으키며혈액투석막 접촉후 증가되는 것으로 보고되고 있어 말기신부전환자의 잔여신기능 감소와 관련이 있을것으로 예측된다. 저자는 혈액투석전과 개시 1개월후 환자의 단핵구에서 IL-1β, TNF-α의 유전자 발현 및 상청액에서 level을 관찰하고 이들 단핵구 배양액의 상청액 및 기지의 싸이토카인을 배양된 인 근위세뇨관상피세포에 주입한후 이들 상피세포에서 아포프토시스 관련 Fas유전자의 발현을 관찰하여 염증성 싸이토카인의 biological effect와 함께 투석개시후 잔여신기능 감소의 기전을 밝히고자 한다. **방법**: 투석개시전과 투석개시 1개월후 환자의 혈액으로부터 단핵구를 분리하여 RNA를 추출한뒤 RT-PCR 및 부유액에서 ELISA법으로 IL-1β 및 TNF-α의 발현을 mRNA와 단백수준에서 정량하였다. 인근위세뇨관 상피세포를 배양한 뒤 6-well plate에 10^{-5}씩 분주하고 IL-1β, TNF-α를 각각 20 pg/ml, 0.1ng/ml, 혈액투석 개시 1개월후 분리한 단핵구 배양 부유액을 분주하여 4시간, 24시간동안 노출시킨 다음 Fas 유전자 발현을 RT-PCR법으로 정량하였다. **결과** :

1) mRNA and protein expression of IL-1β, TNF-α in PBMC

	RT-PCR		ELISA	
	IL-1β	TNF-α	IL-1β	TNF-α
Prehemo	0.99' ± 0.43	1.82 ± 1.24	2.25 ± 0.5	3.5 ± 2.08
posthemo	1.13 ± 0.14*	1.67 ± 0.55	4.25 ± 3.77	4.0 ± 4.3

* $p < 0.05$

2) Fas mRNA expression in human proximal tubular cells

control	0.43±0.35
IL-1β 4hr	2.23±2.12*
IL-1β 24hr	0.91±0.31
TNF-α 4hr	0.65±0.43
TNF-α 24hr	2.7±2.35*
PBMC SN4hr	1.03±0.14
PBMC SN24hr	0.95±0.54

* $p < 0.05$ compared to control

결론:투석막의 생체부적합성에 의해 생성이 증가하는 IL1-β, TNF-α는 근위세뇨관 상피세포에서 Fas 유전자를 통해 매개되는 아포프토시스를 유발하고 이는 혈액투석개시후 잔여신기능감소의 한 기전으로 작용할 것으로 생각된다.

D12

신장 근위세뇨관세포의 $^{45}Ca^{2+}$ uptake에 대한 estradiol-17β -BSA의 효과: cAMP 및 PKC 신호전달계와의 관련성. *한호재, 이연희, 박수현, 최현주, 이산수. 전남대학교 수의과대학 생리학교실, 호르몬연구센터, 광주, 500-757.*

생체 내에서 estrogen은 calcium의 항상성 조절에 관여하며 폐경기 여성에서 estrogen 결핍으로 인한 골다공증이 다발하고 있는 것으로 보고되고 있다. 신장 근위세뇨관은 calcium 재흡수에 중요한 부위로 보고되고 있으나 estrogen에 의한 calcium 조절기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 estradiol-17β-BSA (E_2-BSA)를 이용하여 estrogen이 non-genomic 효과를 통하여 calcium의 조절 작용에 관여하는지를 $^{45}Ca^{2+}$ uptake를 통해 알아보았고 이와 관련된 신호전달계를 조사해보았다.

Estradiol-17β (10^{-9} M) 처리 시 $^{45}Ca^{2+}$ uptake는 4일까지는 대조군과 차이가 없었으나 5일째부터는 유의성 있게 감소하였다. 그러나 E_2-BSA (10^{-9} M) 처리 시 $^{45}Ca^{2+}$ uptake는 2시간 이후부터 증가되었다. 이러한 E_2-BSA의 작용은 tamoxifen (10^{-8} M, 세포내 estrogen 길항제), actinomycin D (10^{-7} M, 전사 억제제) 그리고 cycloheximide (4 x 10^{-5} M, 번역 억제제)에 의해서는 차단되지 않았으나, methoxyverapamil 또는 nifedifine (10^{-6} M, L type calcium channel 차단제들)에 의해서는 차단되었다. 이 결과들은 E_2-BSA가 nongenomic한 경로를 통하여 $^{45}Ca^{2+}$ uptake를 증가시키며, 그 calcium은 주로 세포외 calcium에 의존한다는 것을 말해주고 있다. 그래서 이와 관련된 신호전달계를 알아보았다.

신장 근위세뇨관세포에 8-Br-cAMP (10^{-6} M) 및 TPA (0.02 ng/μl)를 단독처리 시 또는 이들과 E_2-BSA (10^{-9} M)를 병합처리 시 모든 처리군에서 $^{45}Ca^{2+}$ uptake는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 그러나 이러한 $^{45}Ca^{2+}$ uptake 증가는 cAMP 경로 차단제인 SQ 22536 (10^{-6} M, adenylate cyclase 억제제), myristoylated protein kinase A inhibitor amide 14-22 (PKI) (10^{-6} M, protein kinase A 억제제) 및 PLC 억제제인 U 73122 (10^{-6} M) 및 PKC의 억제제인 bisindoylmaleimide I (10^{-6} M)의 전처리에 의해서 차단되었다. 그리고 E_2-BSA 처리 후 세포내 cAMP의 생성과 PKC 활성이 증가되었다.

결론적으로 신장 근위세뇨관세포에서 E_2-BSA (10^{-9} M)는 cAMP 및 PKC 신호전달계를 통하여 $^{45}Ca^{2+}$ uptake를 증가 시켰다.