

**$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone이 싸이클로스포린에 의한 근위세뇨관상피세포의 아포토시스에 미치는 영향에 관한 연구**

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실\*, 신장병연구소\*\*  
조상경, 윤종우, 차대룡, 조원용, 김형규, 원남희\*, 윤수영\*\*, 장경현\*\*

서론: 싸이클로스포린에 의한 신세뇨관상피세포 독성 기전중 아포토시스 및 Fas system activation에 대해 연구하고 아울러 허혈성 신손상시 Fas, FasL 발현 및 아포토시스를 감소시키는 작용이 있는  $\alpha$ -MSH가 싸이클로스포린에 의한 신세뇨관 상피세포의 아포토시스에 미치는 영향에 대해 연구하고자 하였다. 방법: 인근위세뇨관상피세포를 배양하여 각각 배양액만 주입한 대조군, 싸이클로스포린을 500, 1000, 10000ng/ml로 투여한 군 및 싸이클로스포린 1000ng/ml에  $\alpha$ -MSH를 1 $\mu$ M의 농도로 투여한 군으로 나누어 24시간동안 배양한 다른 각각 Fas 유전자 및 FasL, FADD 단백질 발현을 RT-PCR법 및 western blot을 이용하여 관찰하였다. 또한 Fas경로를 통한 아포토시스의 최종단계에 관여하는 caspase3의 활성화를 증명하기 위해 PARP cleavage를 관찰하였고 아울러 아포토시스의 형태학적 증명을 위해 annexin V 및 TUNEL 염색을 시행하였다. 결과: Fas유전자 발현은 대조군의  $0.398 \pm 0.06$ 에 비해 싸이클로스포린 1000ng/ml 투여군에서  $0.59 \pm 0.06$ 으로 유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.01$ ), 증가된 Fas발현은  $\alpha$ -MSH 투여군에서 다시  $0.24 \pm 0.05$ 으로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). FasL 단백질 발현은 대조군의  $2784.5 \pm 565.2$ DI(densitometric index)보다 각각 싸이클로스포린 500, 1000, 10000ng/ml 투여군에서  $5692.5 \pm 1199$ DI,  $5812.5 \pm 841.1$ DI,  $5142 \pm 793.2$ DI로 유의하게 증가하였고 ( $p < 0.01$ )  $\alpha$ -MSH 투여군에서  $3073.5 \pm 677.2$ DI로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.02$ ). FADD 단백질 발현의 경우도 대조군의  $1931 \pm 57.7$ DI에 비해 싸이클로스포린 투여군에서 각각  $3669 \pm 727.4$ DI,  $3609 \pm 285.2$ DI,  $3069 \pm 86.6$ DI로 유의하게 증가하였으며 ( $p < 0.01$ ), 역시  $\alpha$ -MSH 투여군에서  $2353.5 \pm 64$ DI로 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 또한 싸이클로스포린 투여군에서 대조군에 비해 85kDa의 PARP cleavage product가 증가하여 caspase 3의 활성화를 간접적으로 확인할수 있었고, annexin V와 TUNEL 염색상에서도 싸이클로스포린 투여군에서 아포토시스가 일어난 세포의 증가가 관찰되었으며,  $\alpha$ -MSH를 같이 투여한 군에서는 아포토시스 발생을 현저하게 억제하였다. 결론: 이상의 결과로 싸이클로스포린은 세뇨관 상피세포의 Fas, FasL 발현을 증가시키고 결과적으로 caspase 3를 활성화시킴으로서 아포토시스를 일으키는 것으로 생각되며,  $\alpha$ -MSH는 이들 Fas system의 downregulation을 통하여 싸이클로스포린에 의한 세뇨관상피세포의 아포토시스를 억제하는 것으로 생각된다.

## D22

**허혈 및 재관류 신손상쥐에서 Heat shock protein70 유도물 통한 관용기전이 programmed cell death에 미치는 영향**

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 및 해부학교실  
양철우, 김병수, 안희중, 신미경, 박주현, 김용수, 김 진, 장윤식, 방병기

허혈 및 재관류(Ischemia/Reperfusion, 이하 'I/R')손상은 신장에서 이식신의 회복을 지연시키고 이때 투여되는 cyclosporin A(CsA)는 I/R손상을 악화시킨다고 알려져 있다. 이에 저자들은 허혈성 관용기전(ischemic tolerance)의 유도단백질로 알려져 있는 'heat shock protein70 (이하 'HSP70')을 이용하여 I/R 손상 또는 CsA에 의한 신독성을 예방하고자 하는 목적으로 본 연구를 시행하였다.

Sprague-Dawley(250-300 gram)쥐를 이용하였다. 실험군은 대조군과 HSP70유도 유무에 따라 (I/R vs. HSP+I/R 군, I/R+CsA vs. HSP+I/R+CsA 군, 각각 6마리) 5군으로 나누었다. HSP70의 유도는 sodium arsenite(6 mg/kg) 경맥주사함으로써 유도하였고, 허혈 및 재관류손상은 양측 신동맥을 45분간 결찰함으로써 유도하였으며 CsA는 허혈성 신손상직후 20 mg/kg 피하주사 투여하였다. 동물은 24시간간 회복시켰다. HSP70의 유도에 의한 효과는 신장기능(BUN, 혈청 크레아티닌) 및 병리학적조건(PAS염색)으로 하였다. Apoptotic cell death에 대한 HSP70의 효과를 알아보기 위하여 DNA fragmentation analysis, Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL staining)을 시행하였으며 Pro-apoptotic gene(Fas, Fas-ligand, caspase 1 및 3)에 대한 RT-PCR 과 immunoblot을 하였으며, caspase enzyme activity는 fluorometer를 이용하여 측정하였고 신세뇨관내의 mitochondria의 손상정도는 전자현미경조건을 이용하였다.

HSP70 단백질은 sodium arsenite를 주사후 6시간(4.2배)에서 24시간(4.4배)에 증가되었으며 주로 신세뇨관에 발현하였다. 허혈성 신손상을 가할 경우 BUN( $86 \pm 11$  vs.  $36 \pm 6$  mg/dL,  $P < 0.05$ )과 혈청 크레아티닌( $1.6 \pm 0.3$  vs.  $0.6 \pm 0.0$ )이 대조군에 비하여 증가하였으나 HSP70전치군에서는 유의하게 감소하였다(BUN: vs.  $53 \pm 7$  mg/dL, creatinine: vs.  $1.2 \pm 0.2$  mg/dL,  $P < 0.05$ ). CsA를 허혈성손상쥐에 투여하는 경우 신기능이 더욱 저하되었으나(BUN:  $102 \pm 9$ , serum creatinine:  $2.0 \pm 0.2$ ) HSP70을 유도할 경우 회복되었다. 신세뇨관의 손상은 I/R군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며( $2.6 \pm 0.4$  vs.  $0 \pm 0$ ,  $P < 0.05$ ) HSP70을 유도할 경우 현저히 감소하였다. DNA laddering은 허혈 및 재관류손상을 받은 쥐의 수검에서 확인되었으며 HSP70을 전치할 경우 laddering은 감소하거나 소실되었다. TUNEL-양성세포는 HSP70 유도군에서 현저히 감소함을 확인하였다. HSP70유도군에서 신조직의 구조가 잘 유지되고 신세뇨관의 손상이 적음이 확인되었다. Fas, Fas-ligand, caspase 1과 3의 mRNA의 발현양상은 I/R군에서 현저히 증가하였으나 HSP70유도군에서 유의하게 감소함을 확인하였으며 caspase 1과 3의 활성도가 HSP70유도군에서 감소함을 확인하였다. Mitochondria의 integrity는 HSP70유도군에서 잘 유지됨을 확인하였다.

이상의 결과는 HSP70의 유도는 Fas-mediated apoptotic cell death를 억제하고 mitochondria의 integrity를 유지함으로써 I/R손상 및 CsA에 의한 신독성을 예방하는 것으로 이해된다.