

α -melanocyte stimulating hormone이 싸이클로스포린에 의한 근위세뇨관상피세포의 아포프토시스에 미치는 영향에 관한 연구

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

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

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

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 및 해부학교실
양철우, 김병수, 안희종, 신미경, 박주원, 김용수, 김진, 장윤식, 방병기

허혈 및 재관류(Ischemia/Reperfusion, 이하 'I/R')손상은 신장이식에서 이식신의 회복을 지연시키고 이에 부응되는 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+CsA군, 각각 6마리) 5군으로 나누었다. HSP70의 유도는 sodium arsenite(6 mg/kg) 정맥주사함으로써 유도하였고, 허혈 및 재관류손상은 양측 신동맥을 45분간 결찰함으로써 유도하였으며 CsA는 허혈성 신손상직후 20 mg/kg 피하주사 투여하였다. 동물은 24시간에 희생시켰다. HSP70의 유도에 의한 효과는 신장기능(BUN, 혈청 크레아티닌) 및 병리학적 소견(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 전자현미경소견을 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 수질에서 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.