

## 싸이클로스포린 신독성의 발생 기전 및 차단에 관한 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실\*, 신장병 연구소

이소영 · 강영선 · 한상엽 · 조상경 · 차대룡  
조원용 · 김형규 · 원남희 · 장경현 · 이태곤

**배 경 :** 싸이클로스포린 신독성의 기전은 과거 endothelin 등에 의한 혈관 수축으로 조직에 만성적인 허혈이 지속되는 것으로 주로 설명하였으나 최근 싸이클로스포린의 직접적 독성으로 인한 세뇨관 상피 세포의 아포프토시스가 중요한 기전으로 작용하고 있음이 밝혀지고 있다. 본 연구는 이러한 아포프토시스에 관여하는 것으로 알려진 Fas, Fas ligand system의 발현 및 또한 B 세포 임파종에서 과다 발현되며 이들의 상호 균형으로 아포프토시스에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 Bcl2 단백질 가족 중 Bcl2와 Bax 단백질 발현, 그리고 비특이적 항염증 효과가 있으며 본 교실 연구에서 허혈성 신손상시 아포프토시스를 감소시키는 효과가 있음이 밝혀진  $\alpha$ -MSH의 싸이클로스포린에 의한 신 세뇨관의 아포프토시스에 미치는 영향을 in vitro와 in vivo에서 각각 관찰하고자 하였다.

### 방 법 :

1) in vitro study : HK-2 cell(human kidney-2)을 배양한 후 각각 싸이클로스포린을 500, 1000, 10,000ng/ml의 농도로 주입한 군 및 동량의 vehicle을 주입한 대조군, 싸이클로스포린을 주기전 MSH를 1  $\mu$ M의 농도로 주입한 군으로 나누어 각각, 24, 72시간 동안 배양한다. 각 배양된 세포에서 Fas, Fas ligand, FADD, PARP를 RT-PCR 과 western blot analysis로 관찰하였다.

2) in vivo study : 수컷 Sprague-Dawley rat에 저염식이를 주었고, 싸이클로스포린을 30mg/kg의 용량으로 각각 7일간 매일 피하 주사한 군과 vehicle을 동량 투여한군, 그리고 싸이클로스포린과 MSH를 같이 주사한 세 군으로 나누었다. 투여한 후 7일째 혈액을 채취하여 생화학적 검사를 시행하였고, 신장을 적출하여 일부는 조직학적으로 관찰, 아포프토시스의 발생 정도를 정량화 하였고, 일부는 액화 질소에 급속 냉동한후 Fas, Fas ligand, Bcl2, Bax mRNA를 RT-PCR로, 단백질 발현을 western blot analysis로 관찰하였다

### 결 과 :

1) in vitro study : Fas mRNA(ratio of Fas/L-19)의 발현은 vehicle 투여군에서  $0.4 \pm 0.06$ 였으나, 싸이클로스포린 1000ng/ml 투여군에서  $0.59 \pm 0.06$ 로 증가하였고( $p < 0.01$ ), MSH 투여시  $0.24 \pm 0.05$ 로 감소하였다( $p < 0.01$ ). Fas-ligand 단백질은  $2784.5 \pm 565.2$  DI(densitometric index)에서 싸이클로스포린 500, 1000, 10000 투여시  $5692.5 \pm 1199$ ,  $5812 \pm 841.1$ ,  $5142 \pm 793.2$ DI로 증가하였으며,  $\alpha$ -MSH투여시  $3073.5 \pm 677.2$ 로 감소하였다( $p < 0.01$ ). FADD 단백질 발현도 1931  $\pm$  57.7에서  $3669 \pm 727.4$ ,  $3609 \pm 285.2$ ,  $3069 \pm 86.6$ DI로 각각 증가하였으며( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ),  $\alpha$ -MSH투여시  $2353 \pm 64$ DI로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 또한 싸이클로스포린 투여군에서 PARP의 분리도 명백히 관찰되었고 세포내막의 phosphatidyl serine이 세포외막으로의 전위가 일어났으며 DNA의 fragmentation이 관찰되었다.

2) in vitro study : ①생화학적 검사: BUN은 vehicle 투여군과 싸이클로스포린 투여군에서 각각  $14.1 \pm 1.49$ ,  $25.01 \pm 3.69$  ( $p = 0.119$ )로 유의한 차이는 없었고, 싸이클로스포린 투여군과 싸이클로스포린과  $\alpha$ -MSH를 같이 투여한 군에서도  $25.0 \pm 3.69$ ,  $22.9 \pm 0.89$ 로 역시 두군간에 유의한 차이는 없었다. Cr

수치는 vehicle투여군이  $0.26 \pm 0.15$ , 싸이클로스포린 투여군이  $0.5 \pm 0.13$ ( $p=0.224$ ) 였고, 싸이클로스포린 과  $\alpha$ -MSH 투여군이  $0.45 \pm 0.22$ ( $p=0.49$ )로 역시 각 군간에 유의한 차이는 없었다. ② Bcl2와 Bax : Bcl2는 vehicle 투여군이  $3210.3 \pm 385$ DI(desitometric index), 싸이클로스포린 투여군이  $1242 \pm 41$ DI ( $p=0.029$ ), 싸이클로스포린과  $\alpha$ -MSH 투여군이  $2199 \pm 358$ DI( $p=0.13$ )로 아포프토시스시 감소하며,  $\alpha$ -MSH에 의해 증가하는 경향을 보였고, Bax는 vehicle 투여군이  $1 \pm 0$ DI, 싸이클로스포린 투여군이  $2958 \pm 454$ DI( $p=0.01$ ),  $\alpha$ -MSH를 같이 투여한군이  $26.7 \pm 24$ DI( $p=0.001$ )로 아포프토시스시에 통계적으로 유의하게 증가하며,  $\alpha$ -MSH투여시 감소하는 소견을 보였다.

**결론** : 싸이클로스포린은 배양한 신장 근위 상피 세포 및 동물 실험에서 아포프토시스를 유발하며 여기에 Fas, Fas-ligand가 중요한 역할을 할것으로 생각된다. 또한 싸이클로스포린의 상피 세포 독성을 조기에 예측하는데 BUN/Cr 등의 생화학적 지표는 별의미가 없으며 Bcl2는 survival factor, Bax는 lethal factor로 작용할것임을 예측할수 있었다. 또한  $\alpha$ -MSH가 싸이클로스포린에 의한 신독성을 치료 하고 나아가 이를 예방함으로써 신 이식후 장기적인 이식신 기능 개선에 도움이 될 수 있는 치료의 개발에 도움을 줄수 있을것으로 생각된다.