

### 허혈성 신손상시 osteopontin의 발현 양상 및 이에 미치는 $\alpha$ -MSH의 영향에 대한 연구

이소영<sup>1,2</sup>, 조상경<sup>1,2</sup>, 권정은<sup>2</sup>, 조원용<sup>1,2</sup>, 김형규<sup>1,2</sup>, 원남희<sup>3</sup>

고려대학교 의과대학 신장 내과<sup>1</sup>, 신장병 연구소<sup>2</sup>, 해부 병리과<sup>3</sup>

**목적** : Osteopontin은 44kd의 glycoprotein으로 다양한 상피 세포 및 거대 세포에서 발현되며 그 역할도 매우 다양하여 염증 매개 물질 및 신 손상후의 회복의 지표로도 알려져 있다. 본 연구에서는 급성 허혈성 신손상 백서에서 손상 정도를 달리 한 후 osteopontin의 발현 양상과 염증 세포의 표지자인 ED1, 신기능 회복의 표지자인 PCNA의 발현 양상을 비교하고 허혈성 신 손상을 경감시키는 효과가 있는 것으로 알려진  $\alpha$ -MSH의 이들의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 osteopontin의 역할을 규명하고자 하였다.

**방법** : 200-300g의 백서를 이용하여 15분, 45분, 60분간 양측 신혈관을 결자하여 허혈성 신손상을 주었고 24시간, 48시간, 72시간의 재관류를 하였다. 각각 두군으로 나누어 재관류 직후,  $\alpha$ -MSH 투여군과 vehicle 투여군으로 나누어 BUN/Cr을 측정하였고 osteopontin 단백질 발현을 western blot analysis로 비교하였고 면역 염색하여 osteopontin, ED1, PCNA 발현을 비교하였다.

**결과** : osteopontin 단백질 발현은 15분, 45분, 60분의 허혈성 손상이 심할수록 증가하는 경향을 보여 densitometric index(DI)가 2272, 3618, 3752로 증가하는 경향을 보였고(sham : 642,  $p=0.078$ ,  $p=0.007$ ),  $\alpha$ -MSH는 재관류 24시간의 BUN/Cr을  $141.4 \pm 16.8/2.63 \pm 0.53$ 에서  $47.0 \pm 9.2/1.03 \pm 0.12$ 로 감소시켰고( $p=0.04$ ) 이때 osteopontin 단백질 발현도  $2891 \pm 49$  DI(densitometric index)에서  $1428 \pm 105$  DI로 의미있게 감소시켰다( $p=0.006$ ). 면역 염색에서도 재관류 초기 바깥쪽 신수질의 원위 세뇨관에서 나타난 osteopontin 양성 세포는 ED1, PCNA의 발현 위치와 일치하는 경향을 보였으며, ED1 양성 세포수는 대조군에 비해  $\alpha$ -MSH의 투여에 의해 유의하게 감소하였다( $65.12 \pm 12$  :  $7.68 \pm 1.6$ ,  $p<0.05$ )

**결론** : osteopontin은 허혈성 신손상시 신손상 정도가 심할수록 강하게 발현되며 이는 신손상의 회복과 관련이 있을 것으로 생각되고  $\alpha$ -MSH는 허혈성 신손상을 준 백서에서 신손상을 감소시키며 osteopontin의 발현도 감소시키는 결과를 보였다.

### 허혈성 손상을 유발한 인근위 상피 세포에서 $\alpha$ -MSH가 Tumor necrosis factor $\alpha$ 및 Tumor necrosis factor $\alpha$ 에 의한 apoptosis에 미치는 영향에 대한 연구

이소영<sup>1,2</sup>, 조상경<sup>1,2</sup>, 권정은<sup>2</sup>, 조원용<sup>1,2</sup>, 김형규<sup>1,2</sup>, 원남희<sup>3</sup>

고려대학교 의과대학 신장 내과<sup>1</sup>, 신장병 연구소<sup>2</sup>, 해부 병리과<sup>3</sup>

**목적** : 급성 신부전을 유발하는 허혈, 재관류 손상시의 병태 생리적 기전은 아직 명백히 규명되지는 않았으나 국소 염증 반응이 중요한 역할을 하며 이러한 염증 반응을 매개하는 대표적인 염증성 화학 물질인 Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )가 허혈, 재관류 손상시 발현이 증가 되고 이것이 신조직의 염증성 손상 및 apoptosis에 관여한다고 보고되고 있다.

저자는 허혈성 신손상 초기에 세뇨관 상피 세포에서 생성이 증가되는 TNF $\alpha$ 가 신손상의 주된 요소로 작용할 것이라는 가정에 사람 근위 세뇨관 상피 세포를 배양하여 화학적 저 산소증을 유발한후 TNF $\alpha$ 의 발현을 살펴보고, 또한 이 과정에서 TNF $\alpha$  유전자의 생성을 증가시키는 것으로 알려진 NF $\kappa$ B의 활성을 관찰하였다. 또한 강력한 항염증 작용을 가지며, 허혈, 재관류 손상시 신손상 경감 효과를 가지는 것으로 보고된 바 있는  $\alpha$ -MSH의 이에 대한 효과를 연구 하였다.

**방법** : 제대 배양 6-7회된 사람 근위 상피 세포를 이용하여 2 $\mu$ M의 antimycin A와 농도를 달리한 deoxy-D-glucose를 이용하여 화학적 저 산소증을 유발하였으며(대조군), 실험군은 저 산소증을 유발하기 24 시간 전에 50 $\mu$ M의  $\alpha$ -MSH를 추가하여 대조군과 비교 관찰하였다. TNF $\alpha$ 의 발현은 semi quantitative RT-PCR 방법을 이용하여 비교하였고, NF $\kappa$ B의 발현 양상은 gel shift assay를 이용하여 비교하였다. 각 군 세포의 apoptosis 발생 정도는 TUNEL 및 DNA laddering으로 비교하였다.

**결과** : antimycin A와 deoxy-D-glucose의 농도를 각각 달리하여 apoptosis를 가장 많이 유발하는 조건을 정하였는데, 2 $\mu$ M의 antimycin A와 10mM의 glucose를 투여하여 ATP level을 정상 25% 정도로 감소시킨 군(group A)과 10mM의 deoxy-D-glucose만을 투여하여 ATP level을 정상 50% 정도로 감소시킨 군(group B)에서 apoptosis를 보인 세포가 가장 많았다. group B와 이에  $\alpha$ -MSH를 투여한 군에서 TNF $\alpha$ 에 대한 RT-PCR을 한 결과, densitometry로 측정된 L19에 대한 TNF $\alpha$  mRNA의 비율이  $105.15 \pm 16.5$ (group B)와  $18.75 \pm 0.85$ (group B+ $\alpha$ -MSH)로  $\alpha$ -MSH의 투여가 TNF $\alpha$  mRNA의 발현을 유의하게 억제하였다( $p<0.00$ ). NF $\kappa$ B의 활성도를 보기 위한 gel shift assay 결과에서도  $\alpha$ -MSH 투여군에서 대조군보다 NF $\kappa$ B의 활성 정도가 감소하였으며, 세포의 apoptosis를 보기 위하여 시행한 TUNEL 및 DNA laddering에서도 group A와 B의 대조군에서보다  $\alpha$ -MSH 투여군에서 유의하게 apoptosis가 감소하는 조건을 보였다.

**결론** :  $\alpha$ -MSH는 배양한 신상피 세포에서 화학적 저 산소증에 의한 세포의 apoptosis를 감소시키며 이러한  $\alpha$ -MSH의 신손상 경감 효과는 부분적으로 TNF $\alpha$  및 그와 관련된 신호전달물질인 NF $\kappa$ B, P38 MAP kinase의 활성과 관련이 있을 것으로 생각할 수 있겠다.