

배양된 사람의 혈관간 세포에서 IgA 면역복합체에 의한 Ras 신호전달계의 활성화 : 단백질체학적 분석

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실*, 해부학교실†

진동찬 · 최영진* · 차정호† · 왕은휘* · 이명자 · 김용수 · 강창석* · 장윤식 · 방병기

목적 : 우리나라 및 전세계적으로 가장 흔한 만성사구체 신염인 Ig A 신증의 병리학적 기전 중 IgA 면역복합체의 침착 및 이에 의한 면역학적 사구체 손상기전의 규명을 위하여 배양된 사람의 사구체 혈관간 세포를 활성화된 IgA 면역글로불린과 보체로 자극한 후 대표적인 염증 매개 물질인 MCP-1의 분비를 측정하고 혈관간세포의 세포질에 대한 단백질체학적 분석 (proteomic analysis)을 시행하였다.

방법 : 혈관간 세포는 환자에서 적출된 신장의 정상부위에서 사구체를 분리하여 일차 배양 한 후 4-6 계대를 이용하였으며 IgA 면역글로불린을 활성화 및 복합체화 (dimerization) 시키기 위하여 63°C로 가열 처리하여 배양된 혈관간 세포에 500 ug/mL까지 용량별로 투여하였고 추가 면역 손상 기전을 위하여 보체 (complement)도 투여하였다. 면역학적 자극의 결과를 확인하기 위하여 면역 복합체 자극 후 24시간에 배양액에서 MCP-1의 분비량을 효소면역측정법 (sandwich ELISA)으로 측정하였고 이어 세포를 용해시켜 2D 전기영동 (2 dimension electrophoresis)을 하였으며 이것에서 확인된 단백질을 MALDI-TOF mass spectrometry로 분석하여 활성화된 세포내 단백질의 변화를 규명하였다.

결과 : 혈관간 세포에 대한 면역 복합체와 보체의 자극에 의한 MCP-1의 분비는 기저상태에서 6.78 ng/mL, IgA 복합체 10 ug/dmL와 보체투여 시: 5.02 ng/mL, 50 ug/mL 투여 시 7.27 ng/mL, 250 ug/mL 투여 시 12.37 ng./mL, 500 ug/mL 투여 시 15.28 ng./mL로 용량에 따라 유의있는 증가를 보였으며 같은 량의 IgG 면역복합체와 보체 투여 시 각각 5.17, 4.07, 4.99, 3.76 ng/mL의 MCP-1이 분비되어 유의있는 증가가 없었으므로 이 반응의 IgA 면역복합체 특이성을 보였다. IgA 면역 복합체로 자극된 혈관간 세포를 lysis buffer로 추출하여 2D 전기영동 분석한 결과 각각의 gel로부터 약 500개의 단백질 spot을 관찰할 수 있었으며, 그 중 면역 복합체로 자극 된 혈관간 세포에서 발현량이 변화하는 단백질 12개의 spot이 확인되었고 이 spot들 중 11개는 자극 후 발현량이 증가하였으며, 1개는 발현량이 감소하였다. 발현량이 증가하는 단백질 spot 중 8개의 spot을 Maldi-TOF mass spectrometry 분석과 proteoinformatics 분석을 정리하여 Ras related protein TC21, splicesome associated protein SAP 145, tubule의 구조 단백질인 zyxin, "negative" acute phase protein인 apolipoprotein A-1 등의 단백질을 확인하였다.

결론 : 배양된 혈관간 세포에 대한 IgA 면역복합체의 자극으로 염증성 매개물질인 MCP-1의 생성 및 분비가 증가하며 이 기전에 Ras 관련 신호전달체계가 연관되어 있을 가능성을 시사한다.