

복막중피세포의 중간엽 세포로의 전환에 있어서 hemin의 역할에 대한 연구

울지대학교 의과대학 내과학교실¹, 울지대학교 의과대학 병리학교실²

신중호¹, 방기태¹, 정진욱¹, 조성민¹, 김주헌²

Role of Hemin mediating Epithelial to Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelium

Jong Ho Shin¹, Ki Tae Bang¹, Jin Uk Jeong¹, Seong-min Jo¹, Joo-Heon Kim²

Departments of Internal Medicine¹, Eulji University School of Medicine
Department of Pathology², Eulji University School of Medicine

목적: 복막투석을 장기간 시행하는 환자에게 있어 중피상피 세포의 중간엽 세포로의 전환이 관찰되며 이는 복막 섬유화의 초기 단계로 간주된다. 이렇게 진행된 복막 손상은 투석 기능의 소실로 이어질 수 있으므로 복막투석에 의존하는 말기신부전 환자에게 있어 이는 매우 심각한 문제라 할 수 있다. 본 연구는 투석액내의 고농도의 포도당이 사람의 복막 중피세포에서 미치는 영향을 분석하고, 그간 연구를 통해 편측 요관 폐쇄로 유발되는 간질세뇨관 섬유화를 억제하는 작용을 한다고 보고된 바 있는 hemin을 투석액과 함께 투여 하였을때, 복막 중피세포의 중간엽 세포로의 전환에 있어서도 방어적 역할을 하는 가에 대해 분석하고자 한다.

방법: 복강 수술을 받는 환자로부터 동의를 구하여 환자의 일부 그물막을 세척하여 지속적인 자극과 함께 보관한다. 보관한 뒤 부유액은 원심분리하고 복막 중피 세포는 배지에 배양한다. 접종 48시간이후 배지액의 반은 교환한다. 그리고 전체 배지액은 3일에 한번씩 교환한다. 세포배양 용기에서 자라는 복막 중피 세포들의 성장을 멈추게 하기 위해 혈청이 없는 배지액에 24시간 동안 보관한 뒤, 배지는 일정 농도의 포도당을 포함하는 혈청이 없는 배지액으로 2일에서 7일까지 바꾼뒤 3일에 한번씩 교환시켜 준다. 같은 농도의 L-Glucose는 삼투압 대조군으로 사용한다. 각 실험후에 총 세포성 RNA는 TRIZOL로 추출하고 오염된 DNA는 DNase를 사용해서 제거한다. DNA가 없는 RNA는 cDNA로 역전사 시킨다. PCR 분석은 5 μ L of cDNA과 10 μ L of SYBR Green PCR master mix 그리고 5 pM of sense primers의 총 20 μ L의 부피로 이용한다. 여기서 사용되는 모든 primer들은 Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems)을 이용해서 만들고 homology검사는 BLAST에서 시행한다. 통계적 분석을 위하여 적어도 3회의 독립적인 PCR과정을 시행할 예정이다. Housekeeping gene으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 사용해서 상대적인 mRNA의 발현율을 분석할 예정이다. E-cadherin (BD Bioscience, Bedford, MA), human α -SMA (Sigma)에 대한 쥐의 단일 클론 항체를 이용할 것이다. 각 일차항체와 chemiluminescence detection 향상을 위해 alkaline phosphatase conjugated secondary antibodies를 이용한다. Positive immunoreactive bands는 densitometry를 이용해서 분석하고 human α -actin (Sigma)의 발현을 대조군으로서 이용하여 비교한다. 고농도의 포도당에 의해 유발된 복막 중피세포의 중간엽 세포로의 전환에 대한 hemin의 영향을 분석하기 위해, 고농도포도당과 함께 hemin을 투여 한 군에 대하여도 같은 실험을 시행하여 복막 중피세포의 중간엽 세포로의 전환에 관련된 인자들의 발현 변화를 분석한다.

결과: 정상 및 대조군으로 사용된 L-Glucose에 노출된 군에 비해, 고농도 포도당에 노출된 군에서는 노출된 기간에 따라 복막중피세포의 형태학적 변성이 더욱 진행됨을 확인할 수 있었다.

대조군과 비교하였을때 고농도포도당 노출군에서 정상 복막중피세포의 표지자인 E-cadherin의 발현 감소와 중간엽세포의 표지자인 α -SMA의 발현 증가를 관찰 할 수 있었다. hemin을 고농도 포도당과 함께 투여하였을 때 위와 같은 변화를 방지할 수 있음을 확인 하였다.

결론: 본 연구를 통하여 복막 투석의 기술적 실패 및 장기간의 복막 투석으로 인한 최악의 합병증이자 아직까지 치료되지 않는 복막의 섬유화의 초기단계로 간주되는 중피상피 세포의 중간엽 세포로의 전환에 대한 hemin의 방어적 역할을 확인할 수 있었다.

Key Words: 복막투석, 헤민, 복막섬유화

Peritoneal dialysis, Hemin, EMT