

사람의 혈관간세포에서 Cyclosporine이 반응성 산소종(Reactive Oxygen Species)과 세포의 기질 축적에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

채현기 · 이수진* · 김현준* · 공 구* · 강경원 · 강종명

(요 약)

목 적 : 신장이식 환자에서 Cyclosporine(CsA)의 장기간 투여는 신간질의 섬유화와 사구체의 경화증을 유발시킨다. 이와 같은 신간질의 섬유화와 사구체의 경화증은 세포의 기질의 합성이 증가하거나 혹은 분해가 감소함에 따라 결과적으로 세포의 기질이 축적됨으로써 발생하며, CsA의 투여는 이러한 기질의 합성 혹은 분해 과정에 변화를 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 최근 세포의 기질의 축적에 반응성 산소종이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있으며, CsA이 배양세포에서 반응성 산소종을 발생시킬 수 있다는 일부 보고가 있으나 아직 확실하지는 않다.

따라서 저자들은 CsA이 반응성 산소종의 발생과 연관이 있는지를 확인하고, CsA에 의해 발생한 반응성 산소종이 배양세포에서 세포의 기질의 축적에 어떤 영향을 미치는지를 조사하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 : 4대에서 8대 사이의 계대배양한 인간의 혈관간세포에 CsA를 각각 다른 농도(0, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 투여하여 각각에 의한 세포의 생존율 및 증식을 측정하였으며, 반응성 산소종의 발생을 유세포 계측기로 측정하였고, 아울러 CsA(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 항산화제(antioxidant)인 N-acetylcysteine(1mM NAC)을 동시에 투여하여 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생 증가에 항산화제가 미치는 영향을 조사하였다. 반응성 산소종의 발생 외에 Collagen III, MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP 등의 mRNA 발현은 RT-PCR 방법을 이용하여 확인하였고, MMP-2의 활성도는 zymogram으로 측정하였다.

결 과 : 실험에 사용한 CsA의 농도에서는 세포들의 생존율에 영향을 주지 않았다. CsA은 농도에 비례하여 세포의 증식을 억제하였으며, NAC의 투여는 CsA에 의한 세포증식 억제효과를 방지하였다. 또한 CsA은 반응성 산소종의 발생을 증가시켰으며, NAC의 투여는 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생을 방지하였다. CsA은 MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP, Collagen III mRNA의 발현에는 영향을 미치지 못했으나, MMP-2의 활성도는 CsA의 농도에 비례하여 감소하였고, 감소된 MMP-2의 활성도는 NAC에 의해 회복되었다.

결 론 : 이상과 같은 실험을 통해 본 연구자는 배양한 인체의 혈관간세포에서 CsA은 반응성 산소종의 발생을 증가시키며, 발생된 반응성 산소종은 혈관간세포의 증식을 억제하는 원인으로 작용하였을 것으로 생각한다. 또한 CsA의 투여 농도에 비례하여 기질분해 효소인 MMP-2의 활성도가 후전사차원(post-transcriptional level)에서 감소되며, 감소된 MMP-2의 활성도가 NAC에 의해 회복되는 것으로 보아 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생은 MMP-2 활성도의 억제에도 관여하는 것으로 생각된다.

결론적으로 CsA의 장기 투여에 따른 사구체 경화증의 한 기전으로 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생 증가도 관련이 있을 것으로 생각하며, 항산화제의 투여는 CsA에 의해 발생하는 사구체 경화증의 발생을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각한다. 추후 이에 대한 동물 및 사람에서의 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

서 론

Cyclosporine(CsA)의 사용으로 신이식의 성공률은 크게 증가되었으나 CsA의 장기 투여는 신간질의 섬유화 및 사구체 경화증을 유발시킬 수 있으므로¹⁻³⁾, 이와 같은 신장의 섬유화를 방지하는 것이 이식신의 기능을 장기간 유지하는데 필수적이다. 정상 신장에서는 세포의 기질(extracellular matrix)의 합성과 분해가 역동적인 평형상태에 있어 일정한 상태를 유지하지만, 신장의 섬유화는 과도하게 세포의 기질이 많이 생성되거나^{4, 5)}, 혹은 생성된 기질이 효과적으로 분해가 되지 않아⁶⁾ 세포의 기질이 축적됨으로써 섬유화가 발생된다.

Truong 등⁷⁾은 CsA를 투여하면 신장에서 혈류 역동학적인 변화가 생겨 이로 인한 신장의 혈류 감소가 신장 섬유화의 기전이라고 하였으나, Nast 등⁸⁾과 Benigni 등⁹⁾은 신장의 혈류 변화 없이 CsA가 직접적인 섬유화 작용을 일으킨다고 보고하였다. Benigni 등⁹⁾은 CsA를 투여한 후 축적된 세포에서 분비되는 물질이나 성장인자가 섬유화에 관련이 있을 것이라고 하였다.

과도한 기질이 축적되는 기전으로서 기질의 분해에 주로 관여하는 MMP(matrix metalloproteinase)의 활성도가 감소한다는 것이 보고되었으며¹⁰⁾, Caenazzo 등¹¹⁾은 비록 CsA에 대한 실험은 아니었지만 신장의 섬유화 발생기전에 대한 실험으로 신장의 혈관간세포(mesangial cell)에서 $\alpha 1(IV)$ collagen, MMP-2, TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2)의 평형상태가 변화하여 신장의 섬유화가 발생한다고 하였다. Johnson 등¹²⁾은 CsA를 투여하면 신장의 피질부 섬유모세포에서 MMP-2의 활성도가 감소하고 collagen 합성은 증가된다고 보고하였다. Ghiggeri 등¹³⁾은 배양한 혈관간세포에서 CsA의 투여는 collagen III를 증가시킨다고 하였다.

배양 중인 세포에 CsA를 투여하면 반응성 산소종(reactive oxygen species; ROS)이 발생한다고 보고

되고 있는데¹⁴⁻¹⁶⁾, 인체의 대사과정에서 발생하는 이 반응성 산소종은 여러 가지로 다양한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 고농도에서는 세포에 직접적인 독성을 나타내지만¹⁷⁾, 낮은 농도에서는 세포 신호전달 분자로 작용하거나 유전자의 전사인자에 영향을 미치며^{18, 19)}, 효소의 활성에도 영향을 미치고²⁰⁾, 세포의 증식을 촉진²¹⁾ 또는 apoptosis를 유도하는 등^{22, 23)} 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 반응성 산소종과 섬유화의 관계를 보면 반응성 산소종을 배양 중인 혈관간세포에 투여하면 collagen III, IV와 TGF- β 의 mRNA 발현을 증가시키고²⁰⁾, 반응성 산소종의 대사물인 페록시아질산염(peroxynitrite)은 섬유모세포에서 MMP의 해독 후 활성도(post-translational activity)를 억제하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

이상과 같이 CsA과 신장 섬유화의 관계, CsA과 반응성 산소종의 관계, 반응성 산소종과 기질의 축적에 대한 개별적인 연구는 보고되고 있지만, CsA를 투여한 후 발생하는 반응성 산소종이 기질의 축적에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다. 이에 저자들은 CsA이 사람의 혈관간세포에서 반응성 산소종의 발생과 관련이 있는지를 확인하고, 이와 같은 반응성 산소종의 발생과 이전의 보고를 통해 주로 증가하는 것으로 알려진 collagen III의 증가와 관련이 있는지, MMP-2의 활성도에 미치는 영향이 있는지 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

1차 배양된 사람의 혈관간세포(primary cultured human mesangial cells)를 사용하였다. 이들 세포들은 10% 우태아 혈청(FBS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)이 들어 있는 RPMI-1640 배지(Gibco Laboratories)에서 5% CO₂ 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였고, S3-S9 사이의 계대 배양 세포를 사용하였다.

2. 세포의 증식 및 생존율 측정

세포의 증식 및 생존율 실험을 위하여 60mm 배양 접시(Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA)에 1×10^5 cell/mL의 세포를 분주한 후, $0 \mu\text{g/mL}$ 의 CsA(대조군) 및 2.5, 5, 7.5, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 CsA를 각각 투여하였고, 아울러 CsA($5 \mu\text{g/mL}$)과 1mM의 N-acetylcysteine(NAC)을 동시에 투여하였다. 이후 10% FBS를 포함한 RPMI-1640 배지에서 48-72시간 동안 배양하였다.

72시간 배양 후 배지를 제거하고 부착된 세포를 0.25% trypsin 용액으로 처리하여 수확하였고, 수확된 세포들의 생존 여부를 확인하기 위하여 0.4% trypan blue로 염색한 후 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 생존 세포수 및 전체 세포수를 측정하여 세포의 증식과 생존율을 구하였다.

3. 반응성 산소종 측정용 유세포 계측기(Flow Cytometry) 분석

반응성 산소종의 측정은 혈관간세포를 60mm 배양 접시에 5×10^4 cells/mL로 분주한 후, [$0 \mu\text{g/mL}$ CsA](대조군), [$5 \mu\text{g/mL}$ CsA](실험군), [$5 \mu\text{g/mL}$ CsA + 1 mM NAC](CsA와 NAC 처리군)을 투여하고 72시간 동안 배양하였다. 수확하기 30분 전에 $5 \mu\text{M}$ DCFH-DA(Dichlorofluorescein diacetate)로 처리하였다. 세포를 수확하여 원심 분리하였고 cell pellet을 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)로 1-2회 세척한 후, PBS 0.5mL에 세포를 풀어 excitation 490nm 파장과 emission 526nm 파장에서 읽어 FACSscaliber(Becton Dickinson)로 분석하였다. FL1-H histogram으로 반응성 산소종의 생성 유무를 결정하였다.

4. MMP-2의 효소 활성도에 대한 Gelatin Zymography

48-72시간 동안 여러 농도의 CsA으로 처리 배양한 혈관간세포 배양액을 농도별로 모아 18,000rpm에서 20분간 원심분리 후 부유물을 제거하고, 환원성 재료가 없는 sample buffer(3% NaDodSO₄, 10% glycerol, 0.00125% bromophenol blue)를 4:1의 비율로 섞은 후 1mg/mL의 gelatin을 포함하고있는 8% polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 제거하기 위해 2.5% Triton X-100을 포함한 50mM Tris-HCl

buffer로 여러번 세척하였고, gel을 metalloproteinase substrate buffer(50mM Tris-Cl pH 8.0, 2mM Calcium chloride)에서 37°C에서 48시간 동안 부양하였다. 그런 후 0.25%의 Coomassie blue로 30분 동안 gel을 염색하였다. 각 band를 densitometer(Bio-1d Software; Vilber Lourmat, La Vallee, France)로 측정하고 정량화 하였다.

5. MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP mRNA 및 collagen III mRNA 측정을 위한 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) 분석

1) RNA 추출

48-72시간 동안 여러 농도의 CsA으로 처리한 혈관간세포를 농도별로 모아 1mL의 RNAzol™ B(Biotec Laboratories, Inc., Houston, Texas) 용액을 넣고 얼음에 5분간 처리 후 chloroform(0.2mL/1mL RNAzol™ B)을 넣고 다시 얼음에 5분간 방치하였다. 그 후 14,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣어 얼음에서 10분간 반응시킨 후, 14,000rpm에서 15분간 다시 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 70% ethanol로 pellet을 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. Pellet에 DEPC로 처리한 증류수를 넣은 후 60°C에서 30분간 pellet을 녹이고 분광광도기(spectrophotometer)를 사용하여 RNA의 농도를 측정하였다.

2) RT-PCR 반응

총 20 μL 의 반응 용량에 1 μg RNA, 5mM MgCl₂, 1 \times RNA PCR buffer, RNase free 증류수, 1mM dNTP Mixture, 1units/mL RNase inhibitor, 0.25 units/ μL Reverse Transcriptase, 2.5 μM Random primers(TaKaRa, Tokyo, Japan)를 섞은 후 30°C에서 10분, 42°C에서 30분, 99°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들고 이를 4°C에 사용 전까지 보관하였다. 종합효소 반응(PCR)은 위 과정에서 만들어진 cDNA 4 μL , 1 \times PCR buffer(50mM KCl), 10mM Tris-Cl (pH=8.0, 0.01% gelatin, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂), 200 μM dNTPs, 1 unit의 Taq DNA polymerase(TaKaRa, Tokyo, Japan)의 혼합액에 각각의 primer 20pmoL을 혼합하여 총 20 μL 의 용량으로 맞춘 후에 DNA thermal cycler를 이용하여 PCR 반응을 시켰다. PCR 반응 조건은 변성(denaturation)은 94°C에서 5분, 소환(annealing; MMP-2 56°C,

TIMP-2 57°C, MT1-MMP 60°C)은 55-66°C에서 1분, 신전(extension)은 72°C에서 10분씩 30-35 cycle로 PCR을 수행하였다. PCR 반응산물은 2% agarose gel에서 전기영동 하였으며, ethidium bromide로 염색한 후 UV 광선하에서 PCR 반응산물을 검색하였다. PCR band는 densitometer로 측정하여 정량화 하였으며, 사용된 primer의 염기 배열은 Table 1과 같다.

결 과

1. CsA이 혈관간세포의 증식 및 생존에 미치는 영향

2.5, 5, 7.5, 10 µg/mL 농도로 72시간 동안 CsA을 투여한 실험군의 세포 생존율은 대조군에 비해 90-100%이었고, 5 µg/mL의 CsA과 1mM의 NAC와 함께 투여한 경우에서도 생존율의 변화는 없었다.

세포의 증식은 각각의 CsA 농도에서 대조군에 비해 88%, 68%, 48%, 36%로 세포의 증식이 억제되어, CsA은 농도에 비례하여 세포의 증식을 억제시켰다. 반면에 항산화제인 NAC를 CsA과 함께 투여한 세포는 대조군과 비슷한 세포의 증식을 보였다(Fig. 1A, B).

2. CsA이 혈관간세포에서 반응성 산소종의 발생에 미치는 영향

CsA을 투여한 후 혈관간세포에서 발생하는 반응성 산소종을 유세포 계측기로 정량화하여 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군(0 µg/mL CsA)에

서는 M1(FL1-H<log 10)이 71.6%이고, 반응성 산소종의 형성이 있는 M2(FL1-H>log 10)가 28.7%였으

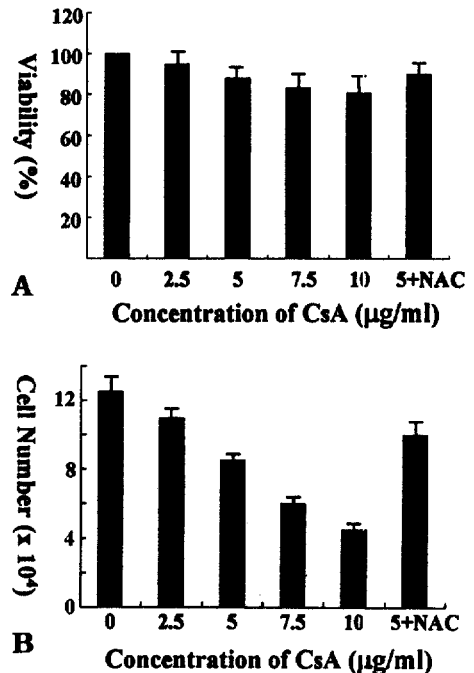


Fig. 1. Viability(A) and proliferation(B) assays for human mesangial cells cultured for 72 hours in the presence of zero, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 µg/mL cyclosporine, and 5.0 µg/mL cyclosporine with 1mM N-acetylcysteine. Values are the mean standard error of 3 different experiments.

Table 1. Primer Sequences for RT-PCR

Genes	Sequences	PCR product(bp)
MMP-2		447
Sense	5'-ACAAAGAGTGGCAGCAA-3'	
Anti-sense	5'-CACGAGCAAAGGCATCATCC-3'	
TIMP-2		590
Sense	5'-TGCAGCTGCTCCCCGGTGCAC-3'	
Anti-sense	5'-TTATGGGTCCTCGATGTCGAG-3'	
MT1-MMP		550
Sense	5'-CCCTATGCCTACATCCGTGA-3'	
Anti-sense	5'-TCCATCCATCACTTGGTTAT-3'	
GAPDH		300
Sense	5'-CGGACTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	
Anti-sense	5'-AGCCTTCTCCATGGTTGGTGAAGAC-3'	
Col III		483
Sense	5'-TGGTGTTGGAGCCGCTGCCA-3'	
Anti-sense	5'-AGTCGAAGGAATGCCAGCTG-3'	

Fig. 2. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species(ROS). Mesangial cells were incubated with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA(A), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA(B), and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA with 1mM N-acetylcysteine(C) for 72 hours. M1 is below log 10 in mean fluorescence signals as the population with low intensity of ROS production and M2 is above log 10 in mean fluorescence signals as the population with high production of ROS. Results represent three independent experiments in triplicates.

나(Fig. 2A), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 CsA 처리 실험군에서는 M2가 74.1%로 반응성 산소종이 생성된 세포군이 현저하게 증가되었다(Fig. 2B). 반면에 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA에 1mM의 NAC를 함께 투여한 세포는 M2가 26.7%로 반응성 산소종의 생성이 현저히 줄어 들었다(Fig. 2C).

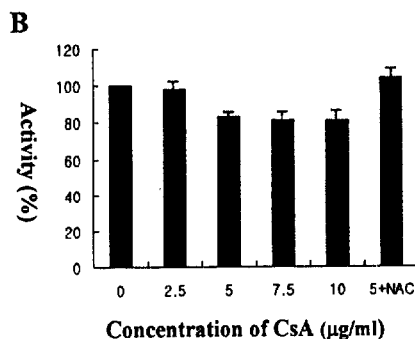


Fig. 3. Effects of cyclosporine on the activity of MMP-2 in human mesangial cells. Gelatin zymography was performed in cultured media with various conditions(A). The activities were quantitated by densitometry (B). Zymogram showed that CsA decreased the MMP-2 activity in dose-dependent manner and decreased MMP-2 activity was recovered by the incubation with NAC (lane 1, control; lane 2, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane 3, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane 4, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lane 5, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA; lane 6, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CsA with 1 mM N-acetylcysteine(NAC)). Values are the mean standard error of 3 different experiments.

3. CsA이 혈관간세포에서 MMP-2 활성도에 미치는 영향

MMP-2의 활성도는 gelatin zymography를 이용하여 분석하였다. CsA의 투여는 농도에 비례하여 MMP-2의 활성도를 감소시켰으며, 대조군에 비하여 약 10-20%의 감소를 보였다. 반면에 항산화제인 NAC를 함께 투여한 경우에는 대조군과 비슷한 MMP-2의 효소 활성도를 보였다(Fig. 3).

4. CsA이 혈관간세포에서 MMP-2, TIMP-2 및 MT1-MMP의 mRNA 발현에 미치는 영향

혈관간세포에서 CsA의 투여는 MMP-2, TIMP-2 및 MT1-MMP의 mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

소종의 역할이 제시되고 있으며^{25, 26)}. 본 실험에서도 유세포 계측기를 이용하여 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 CsA은 농도에 비례하여 세포 증식을 억제하여 Martin 등²⁷⁾의 보고와 유사한 결과를 보여주고 있으며, 특히 본 실험에서는 항산화제 투여로 CsA에 의한 세포증식 억제를 방지할 수 있었다. 따라서 CsA에 의한 세포증식 억제효과는 CsA에 의한 반응성 산소종의 발생과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각한다.

실제 CsA을 투여 중인 환자에서 CsA의 혈중 농도는 1일간 변화의 폭이 매우 크게 나타날 수 있으며, 인체의 여러 조직에서의 CsA 농도는 혈중 농도에 비해 매우 높으며²⁸⁾, Perez de Lema 등¹⁵⁾의 보고에 의하면 배양한 혈관간세포에 CsA을 투여하면 5분에 반응성 산소종이 나타나서 15-45분에 최고에 도달하였다고 하므로, 일시적으로라도 CsA이 조직에서 높은 농도에 이르면 반응성 산소종이 발생할 수 있다. 따라서 본 실험에서 사용한 CsA 농도에서의 반응성 산소종에 의한 세포증식의 억제는 임상적으로도 큰 의미를 가질 것으로 생각한다.

본 연구에서는 TGF- β 에 대한 조사는 실시하지 않았으나 신장의 섬유화에 있어서 TGF- β 는 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. CsA에 의한 신장의 변화에도 TGF- β 가 관련되어 있을 가능성이 있으며, Shihab 등³⁰⁾은 CsA이 피질의 섬유 모세포에서 TGF- β mRNA를 증가시키고 이것이 자가분비(autocrine) 작용으로 기질의 합성을 증가시키고 기질의 분해는 감소시킨다고 보고한 바 있으며, Mo 등⁶⁾은 만성 신섬유화 모델에서 신장의 섬유화는 TGF- β 의 발현과 MMP의 작용 감소와 관련되어 있다고 하였다. Johnson 등¹²⁾은 CsA 투여시 피질 섬유 모세포에서 기질의 축적은 일어나나 전체 TGF- β 에는 변화가 없다고 하였으나, 이것은 TGF- β 가 반응성 산소종의 발생이나 작용과 무관함을 시사하는 것은 아니며 오히려 활성화된 TGF- β 나 TGF- β 수용체와 연관이 되어 있을 가능성이 높은 것을 의미한다.

일반적으로 조직에서 기질을 분해하는 데에는 MMP의 역할이 중요한데 그 중에서도 가장 많은 MMP가 MMP-2이며, 이 효소는 collagen IV에 선택적으로 더 많은 작용을 나타낸다. MMP-2는 세포내에서 만들어져서 비활성화 상태로 분비되어 세포막에 있는 MT1-MMP(membrane type MMP)에 의해 활

Fig. 4. Effects of cyclosporine on the mRNA expressions of MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP in human mesangial cells. There is no significant difference in the amount of MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP mRNA between control cells and cells treated with CsA or/and NAC(lane 1, control; lane 2, 2.5 μ g/mL; lane 3, 5.0 μ g/mL; lane 4, 7.5 μ g/mL; lane 5, 10.0 μ g/mL CsA; lane 6, 5.0 μ g/mL CsA with 1mM N-acetylcystein (NAC)). Results represent three independent experiments in triplicates. Numbers at the bottom indicate the relative expression ratio to GAPDH.

Fig. 5. Effect of cyclosporine on the mRNA expression of collagen III in human mesangial cells. There is no significant difference in the amount of collagen III mRNA between control cells and cells treated with CsA or/and NAC(lane 1, control; lane 2, 2.5 μ g/mL; lane 3, 5.0 μ g/mL; lane 4, 7.5 μ g/mL; lane 5, 10.0 μ g/mL CsA; lane 6, 5.0 μ g/mL CsA with 1mM N-acetylcystein(NAC)). Results represent three independent experiments in triplicates. Numbers at the bottom indicate the relative expression ratio to GAPDH.

5. CsA이 혈관간세포에서 Collagen Type III mRNA 발현에 미치는 영향

CsA은 혈관간세포에서 collagen type III mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 5).

고 찰

CsA에 의한 세포독성 기전 중의 하나로 반응성 산

성화된 형태로 변화되며, 이 활성화 과정을 TIMP-2가 억제한다^{31, 32}). 본 실험에서는 CsA의 농도 증가에 따라서 MMP-2의 활성도가 감소되었으며, 항산화제인 NAC의 투여는 MMP-2의 활성도를 회복시켰다. 반면 CsA은 collagen III mRNA 발현에는 큰 영향이 없었다. 따라서 CsA 투여에 따른 세포의 기질의 축적은 기질의 생성 증가 보다는 MMP의 활성도 감소에 기인될 가능성을 보여주고 있다. 또한 이러한 활성도의 감소가 항산화제인 NAC에 의해 역전되는 것으로 보아 MMP의 활성도 감소에도 반응성 산소종이 관련되어 있음을 추정할 수 있다. 또한 본 실험에서 CsA의 투여는 MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP 등의 mRNA 발현을 증가시키지 못했다. 따라서 CsA의 투여에 따른 반응성 산소종의 발생이 이들 유전자들의 발현에는 작용하지 않고, 전사후 조절기전(posttranscriptional level)으로 MMP-2의 활성도에 작용한 것으로 생각한다. Owens 등²⁴)의 보고와 같이 본 실험의 MMP 활성도의 감소가 해독 후 조절기전(posttranslational level)에서 작용하는 반응성 산소종의 영향인지는 확실치 않지만, 그 가능성은 배제할 수 없다.

사구체에 있는 내피세포도 collagen을 합성하지만 소량의 collagenase를 만들어 낸다³³). 또한 사구체 경화증에서 주로 증가하는 collagen은 I형과 IV형인데, Ghiggeri 등¹³)은 배양한 혈관간세포에 CsA을 투여하면 collagen I, IV의 합성에는 큰 변화가 없고, collagen III가 증가한다고 보고하였다. 따라서 실제로 사구체 경화증의 메산지움에서 증가된 collagen IV는 혈관간세포에서 만드는 MMP-2의 작용 감소와 연관되어 나타났을 가능성이 있을 것으로 생각한다.

Nath 등²⁰)은 혈관간세포에서 과산화 수소(hydrogen peroxide)의 투여는 collagen III, IV, TGF- β mRNA 발현을 증가시켰다는 보고를 하였으나 MMP에 대한 보고는 없었으며, Ghiggeri 등¹³)은 신장의 세포에서 CsA에 의한 세포의 기질의 증가를 조사하였는데, 이 연구에서는 CsA을 비교적 낮은 농도로 사용하였고 기질의 분해에 관한 조사는 하지 않았다. Johnson 등¹²)은 CsA을 근위세뇨관 세포와 피질 섬유모세포에 투여하였을 때 기질의 분해가 감소되고 또한 기질의 생성도 증가하여 섬유화가 증가한다고 보고하였으며, Duymelinck 등³⁴)은 만성적인 CsA 신병증 모델에서 CsA의 투여는 TIMP의 발현을 증가시키지만 MMP의 발현에는 차이가 없다고 보고하였다.

배양세포에서의 기질의 축적에 관한 연구는 기질의 생성 쪽에 초점을 맞춘 연구들이 주로 많으며 기질의 분해에 대한 연구는 비교적 적을 뿐 아니라 보고자에 따라 서로 다른 결과를 보고하고 있다. 그 이유로는 첫째, 각 연구에서 사용한 CsA의 농도와 배양액에 첨가한 우태아 혈청의 농도가 서로 다른 점 때문에 각각 다른 결과가 나타날 가능성이 있다. Wolf 등³⁵)은 CsA의 항증식 효과(antiproliferative effects)의 기전에 대한 연구로 serum-free 배양액을 사용하여 세포의 증식 및 TGF- β 단백질 및 mRNA 발현이 증가한다고 보고하였으며, Perez de Lema 등¹⁵)의 연구에서는 이에 대한 정확한 기술이 없었다. 본 연구는 10% 우태아 혈청(fetal calf serum)을 사용하였고, CsA의 실험 농도는 인체의 CsA 혈중 치료 농도의 10-50배를 기준으로 실험을 하였으며, 생존율에는 영향을 주지 않는 상태에서 CsA을 투여하면서 실험을 진행하였다. 둘째로는 사용한 세포의 종류나 종(species)에 따라서 상이한 결과를 보일 가능성이 있다. Ghiggeri 등¹³)은 인간의 섬유모세포는 CsA 투여에 의해 collagen 합성이 330% 증가하나, 백서의 혈관간세포는 170%, 인간의 혈관간세포는 100% 정도 증가하는 것으로 보고하여, 백서와 인간의 혈관간세포에서 합성되는 collagen의 양에도 차이가 있을 것으로 추정된다.

반응성 산소종은 CsA의 농도와 세포의 종류에 따라 다양한 작용을 나타내는데, 중성구에서는 반응성 산소종이 MMP를 활성화시킨다³⁶), Owens 등²⁴)에 의하면 섬유모세포에서는 MMP의 작용을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 신장에서의 세포의 기질 축적에 대해서도 다양한 결과가 나오는 이유는 연구에 사용된 세포의 종류가 다르며 그에 따라 반응성 산소종의 생성과 작용이 다르게 나타날 가능성도 있다. 따라서 사구체를 구성하는 다른 세포에서도 일정한 조건하에서 반응성 산소종의 발생과 그 작용을 종합적으로 살펴보고 이를 동물 실험을 포함한 생체 연구 실험에서 다시 확인하는 것이 필요할 것으로 생각한다.

요약하면 본 연구에서는 CsA을 투여한 혈관간세포에서 반응성 산소종의 발생을 확인하였으며, 이와 같은 반응성 산소종은 생존율에 영향이 없는 조건에서도 세포의 증식을 억제하였으며, MMP-2의 활성도를 감소시켰다. 따라서 CsA을 투여한 후 발생하는 반응성 산소종이 혈관간세포의 기질분해 효소의 기능을 감소시켜 세포의 기질을 축적시키는 하나의 기전에

기여할 것으로 생각된다.

= Abstract =

The Effects of Cyclosporine on the Generation of ROS and Extracellular Matrix Accumulation in Cultured Human Mesangial Cells

Hyun Ki Chae, M.D., Su Jeon Lee, M.D.*
Hyun Jun Kim, M.D.*, Gu Kong, M.D.*
Kyoung Won Kahng, M.D.
and Chong Myung Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Pathology*,
College of Medicine, Hanyang University,
Seoul, Korea

Objective : Treatment with cyclosporine(CsA) for a long-term period may induce renal glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. Reactive oxygen species(ROS) seems to be involved in the process of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. We investigated the effect of CsA on the generation of ROS and extracellular matrix accumulation in cultured human mesangial cells. We also studied the relationship between ROS formation and extracellular matrix and the effect of antioxidant on ROS formation and/or extracellular matrix degradation.

Methods : Mesangial cells were treated with varying dose of Cyclosporine(0, 2.5, 5, 7.5 and 10 µg/mL) and also with cyclosporine(5 µg/mL) plus N-acetylcysteine(1mM). ROS was measured by flow cytometric analysis. mRNA expression of MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP and collagen III was assessed by RT-PCR method. MMP-2 activity was measured by gelatin zymography.

Results : No significant difference was noted in cell viability with each CsA concentration. CsA inhibited the cell proliferation in a dose dependent manner and induced the expression of ROS. Antioxidant NAC reversed the effect of cyclosporine. CsA had no effect on the mRNA expression of collagen III, MMP-2, TIMP-2, MT1-MMP. However CsA decreased the MMP-2 activity in a dose dependent manner, which was also reversed by NAC.

Conclusion : Cyclosporine-induced ROS may be associated with the extracellular matrix accumulation, that is glomerulosclerosis and interstitial fibrosis by inhibiting the cell proliferation and by decreasing the degradation of extracellular matrix. Antioxidant, at least in vitro, may prevent some of the adverse effects of CsA on renal function.

Key Words : ROS(reactive oxygen species), Cyclosporine, Matrix, MMP(matrix metalloproteinase)

참 고 문 헌

- 1) Myers BD : CsA nephrotoxicity. *Kidney Int* 30: 964-974, 1986
- 2) Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M : CsA-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 311:699-705, 1984
- 3) Bertani T, Ferrazzi P, Schieppati A, et al. : Nature and extent of glomerular injury induced by cyclosporine in heart transplant patients. *Kidney Int* 40:243-250, 1991
- 4) Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T : Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39:550-556, 1991
- 5) El Nahas AM : Pathways to renal fibrosis. *Exp Nephrol* 3:71-75, 1995
- 6) Mo W, Brecklin C, Garber SL, Song RH, Pegoraro AA, Au J, Arruda JAL, Dunea G, Singh AK : Changes in collagenases and TGF-β precedes structural alterations in a model of chronic fibrosis. *Kidney Int* 56:145-153, 1999
- 7) Truong LD, Farhood A, Tasby J, Gillum D : Experimental chronic ischemia : Morphology and immunologic studies. *Kidney Int* 41:1676-1689, 1992
- 8) Nast CC, Adler SG, Artishevsky A, Kresser CT, Ahmed K, Anderson PS : Cyclosporine induces elevated procollagen(I) mRNA levels in the rat renal cortex. *Kidney Int* 39:631-638, 1991
- 9) Benigni A, Bruzzi I, Mister M, Azzollini N, Gaspari F, Perico N, Gotti E, Bertani T, Remuzzi G : Nature and mediators of renal lesions in the kidney transplant patients given cyclosporine for more than one year. *Kidney Int* 55:674-685, 1999
- 10) Murphy G, Docherty AJP : The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:120-125, 1992
- 11) Caenazzo C, Garbisa S, Onisto M, Zampieri M, Baggio B, Gambro G : Effect of glucose and heparin on mesangial α1(IV) COLL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression. *Nephrol Dial Transplant* 12:443-448, 1997
- 12) Johnson DW, Saunders HJ, Johnson FJ, Huq SO, Field MJ, Pollock CA : Cyclosporin exerts a direct fibrogenic effect on human tubulointerstitial cells : Roles of insulin-like growth factor 1, transforming growth factor β1, and platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 289:535-

- 541, 1999
- 13) Ghiggeri GM, Altieri P, Oleggini R, Valenti F, Ginevri F, Perfumo F, Gusmano R: Cyclosporine enhances the synthesis of selected extracellular matrix proteins by renal cells in culture: Different cell response and phenotype characterization. *Transplantation* 57:1382-1388, 1994
 - 14) Perez de Lema G, Arribas-Gomez I, Ruiz-Gines JA, de Arriba G, Prieto A, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M: Reactive oxygen species mediate the effects of cyclosporine A on human cultured mesangial cells. *Transplant Proc* 29:1241-1243, 1997
 - 15) Perez de Lema G, Arribas I, Prieto A, Parra T, de Arriba G, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M: Cyclosporine A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci* 62:1745-1753, 1998
 - 16) Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera J, Navarro-Antolin J, Perez de Lema G, Rodriguez-Puyol M, Lamas S, Rodriguez-Puyol D: Role of reactive oxygen species in the signaling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 124:447-454, 1998
 - 17) Shah SV: The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Ann Rev Physiol* 57:245-262, 1995
 - 18) Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299, 1995
 - 19) Sen CK, Packer AL: Antioxidant and redox regulation of gene therapy. *FASEB* 10:709-720, 1996
 - 20) Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME: Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor- β 1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 53:367-381, 1998
 - 21) Sies H: Oxidative stress. Oxidant and Antioxidant, p650, Academic Press, London, 1991
 - 22) Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ: Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science* 275:1649-1652, 1997
 - 23) Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF: Differential activation of a calcium-dependent endonuclease in human B lymphocytes. Role in ionomycin induced apoptosis. *J Immunol* 155:3297-3307, 1995
 - 24) Owens M, Milligan S, JourdeHeuil D, Grisham MB: Effect of reactive metabolites of oxygen and nitrogen on gelatinase A activity. *Am J Physiol* 273:L445-L450, 1997
 - 25) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902, 1992
 - 26) Wang C, Salahudeen AK: Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934, 1995
 - 27) Martin M, Krichbaum M, Kaeffer V, Goppelt-Strube M, Resch K: Cyclosporine A suppress proliferation of renal mesangial cells in culture. *Biochem Pharmacol* 37:1083-1088, 1988
 - 28) Lensmeyer GL, Wiebe DA, Carlson IH, Subramanian R: Concentrations of cyclosporine A and its metabolites in human tissues postmortem. *J Anal Toxicol* 15:110-115, 1991
 - 29) Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292, 1994
 - 30) Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Noble NA, Border WA, Franceschini N, Bennett WM: Role of transforming growth factor beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 49:1141-1151, 1996
 - 31) Sato H, Takino H, Okada Y, Cao J, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370:61-65, 1994
 - 32) Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 270:5331-5338, 1995
 - 33) Lenz O, Striker LJ, Jacot TA, Elliot SJ, Killen PD, Striker GE: Glomerular endothelial cells synthesize collagens but little gelatinase A and B. *J Am Soc Nephrol* 9:2040-2047, 1998
 - 34) Duymelinck C, Deng JT, Dauwe SE, De Broe ME, Verpooten GA: Inhibition of the matrix metalloproteinase system in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 54:804-818, 1998
 - 35) Wolf G, Thaiss F, Stahl RAK: Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells. *Transplantation* 60:237-241, 1995
 - 36) Saari H, Suomalainen K, Lindy C, Kontinenm YT, Sorsa T: Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Comm* 171:979-987, 1990