급성 신손상 연구의 실험적 기법 : 유세포 분석기를 이용한 신장내 염증반응에 관한 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실

조 상 경

Acute Kidney Injury (AKI) : Flow Cytometric Analysis of Kidney Leukocytes in Acute Kidney Injury

Sang-Kyung Jo

Department of Internal Medicine, Korea University Medical College

허혈/재관류 혹은 신독성 물질에 의한 급성 신손상의 초기에는 혈관 내피세포의 손상이 중요하며 이어 다양한 종류의 염증성 매개물질의 유리 및 이로 인한 염증반응은 급성 신손상의 확장기 (extension phase)에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 신손상 초기의 염증반응은 대개 비 특이적 조직손상에 대한 선천적 면역반응 (innate immunity)의 활성화로 생각되며, 대개 neutrophil, monocytes/macrophages, dendritic cells, natural killer T 세포 등이 관여한다. 이러한 초기 신장 염증반응은 궁극적으로 신장 실질조직의 손상을 악화시킴으로서 신장기능 저하에 기여한다. 급성 신손상의 염증반응에 대한 연구는 최근까지도 주로 허혈/재관류 또는 신독성 물질에 의한 급성 신손상 동물모델에서 1) 전체 신장조직에서 mRNA 및 단백수준에서 염증성 매개물질의 측정 2) 면역형광염색 또는 면역조직화학염색을 통해 신장조직으로 침윤된 백혈구 또는 활성화된 신장내재 백혈구 (resident leukocytes)를 확인하며 3) 다양한 약제 투여 후의 반응을 대조군과 비교하는 방법 등이 주로 이용되었다. 일반적으로 신손상 초기에 신장조직으로 침윤되거나 혹은 활성화된 신장내재 백혈구 뿐 아니라 손상 받은 신장 실질세포에서도 염증매개 물질이 유리되어 신손상을 더욱 악화시키므로 이들 백혈구 세포 각각의 다양한 면역 형질 (immunophenotype) 및 신장손상에의 기여정도를 직접적으로 평가하는 것은 불가능하였다. 또한 면역형광염색 혹은 면역조직화학염색을 통한 백혈구의 신장조직 내에서의 확인 및 면역형질 검사 시에는 조직샘플에 적합한 항체를 찾기가 어려운 경우, 또는 이중염색 (double staining) 등의 기술적인 문제가 장애가 되는 경우가 흔히 있어왔다. 최근에는 여러 가지 면역학적 연구기법이 발달함에 따라 급성 신손상에서의 염증반응 및 면역반응의 연구에 유세포 분석기 (flow cytometry) 를 사용하여 신장 내 침윤 또는 활성화된 내재 백혈구의 면역형질을 정확하게 규명하는 것이 가능해졌을 뿐 아니라 형광활성 세포분리기 (fluorescence activated cell sorter), 또는 자기세포 분리기 등 (magnetic assisted cell sorting, MACS)를 이용하여 신장조직으로부터 연구하고자 하는 특이 백혈구만을 분리하여 조작하는 기술이 이용되고 있다. 이러한 기술을 바탕으로 급성 신손상의 염증반응의 연구에 있어 각각의 다른 백혈구의 특이적인 역할에 대한 직접적인 증거를 제시하는 것이 가능해졌으며 이는 궁극적으로는 급성 신손상의 병태생리기전에 대한 정확한 이해를 바탕으로 새로운 치료전략 (treatment strategy)의 확립, 조기 생물표지인자 (early biomarker) 발견 등 활발하게 진행되고 있는 급성 신손상 분야의 연구에 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

유세포 분석기를 이용한 신장내 백혈구의 형질 규명

실험군 및 대조군의 신장을 적출하여 잘게 썬 다음 collagenase 및 DNAse를 포함하는 PBS 액에 넣어 37℃에서 15분간 반응시킨 후, cell strainer를 통과시킨다. 모아진 신장단세포 부유물 (kidney single cell suspension)을 10% 우태아혈청을 포함

하는 cotton column을 통과시킨 후 1,200 rpm/min의 속도로 10분간 원심 분리한 후 모아진 cell pellet을 1% BSA와 0.1% sodium azide를 포함하는 PBS에 resuspend 시킨다. 다음 비특이적 항체결합을 막기 위해 anti-mouse CD16/32로 처리한 후 우선적으로 얼음 위에서 30분간 anti-mouse CD45 염색을 시행한다. 두 번의 washing 과정 후 보고자 하는 형광표지 항체와의 반응을 상기 조건에서 시행 시키며, washing 과정 후 유세포 분석기 (four color flow cytometry)에서 검사한다.

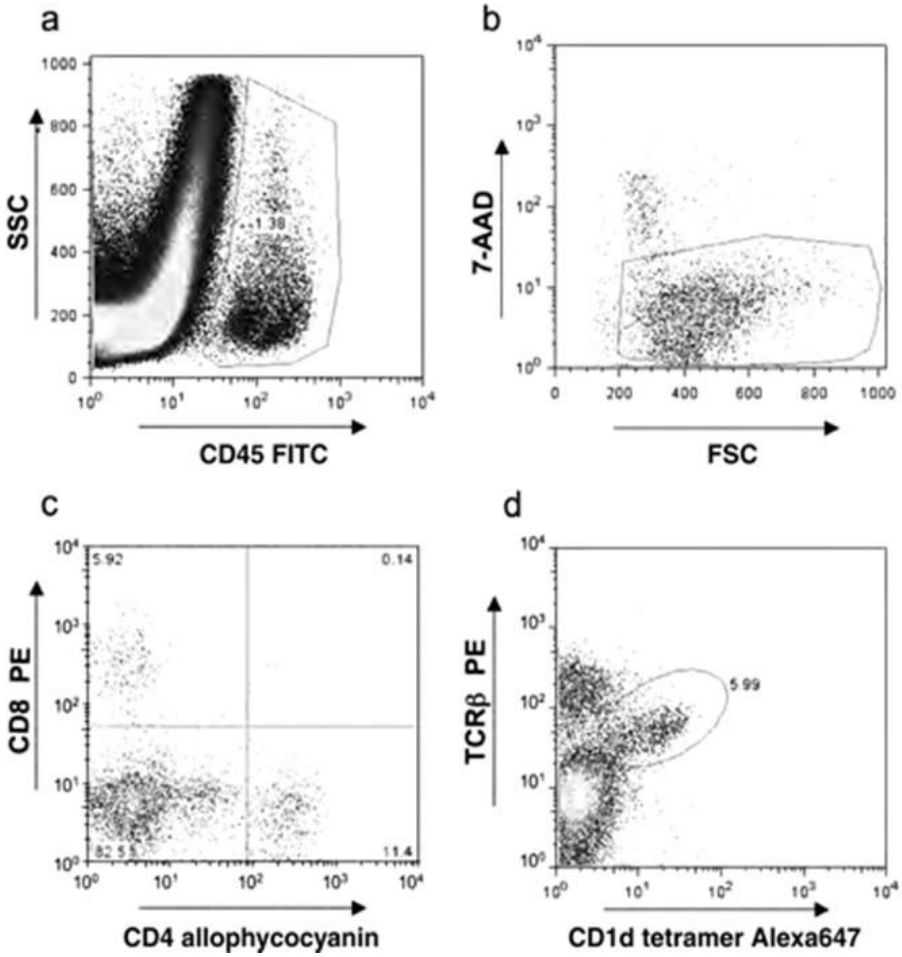


Fig. 1. Examples of flow cytometric detection of kidney CD4, CD8 or NKT cells following I/R. CD45-FITC-anti mouse CD45 Ab was used to identify the total leukocytes population (a) and 7AAD was used to distinguish live cells (7AAD negative cells) from dead cells (7AAD positive cells) (b). After gating viable kidney leukocyte population, CD4+ cells or CD8 cells can be identified using mAb to CD4 or CD8 respectively (c). CD1d tetramer positive NKT cells were also identified (d).

신장조직내 침윤 또는 활성화된 특정 백혈구의 감별 및 면역아형검사

염증세포의 침윤 및 활성화를 조직에서의 면역형광염색이나 면역조직화학염색의 기법만으로 확인하는 것에는 기술적인 제한점이 있으며 또한 특정 백혈구의 활성화 상태나 면역형질을 규명하기는 불가능하다. 또한 한가지 종류의 항체만으로 특정 백혈구 집단을 규명할 수 없다는 단점을 가지고 있기도 하다. 예를 들면 생쥐의 대식세포나 신장내재 수지상 세포의 경우 모두 F4/80 항체에 양성을 보이므로 파라핀 조직에서의 면역조직화학염색을 통해서는 이들 세포를 구별할 수가 없으나 multicolor flow cytometry를 이용하여 $F4/80^{+}$ $CD11c^{+}$ doublepositive(내재 수지상세포) 를 $F4/80^{+}$ $CD11c^{-}$의 대식세포로부터 구별할 수 있다 (Fig. 2). 수지상 세포의 활성화 상태 역시 전통적인 면역형광염색 또는 면역화학조직염색법을 통해서는 제한이 있으나 역시 multicolor flow cytometry를 사용하여 MHC II, CD80 또는 CD86 양성인 $CD11c^{+}$세포를 검사 함으로서 연구할 수 있다.

싸이토카인에 대한 세포내 염색과 신장조직으로부터 특정 백혈구의 분리 및 조작에 의한 백혈구세포 기능검사

급성 신손상 후 염증성 매개물질은 신장조직으로 침윤하는 염증세포 및 신장 실질세포에서모두 생성되어 유리되므로 전체 신장조직에서의 측정으로는 특정 염증세포의 기능 및 신장손상에의 기여도를 평가하는데 제한점이 있다. 최근 여러가지 싸이토카인이나 케모카인등에 대한 mAb를 이용하여 세포내 염색 (intracellular staining)을 시행한 후 유세포 분석기를 통과시킴으로서 급성 신손상시 특정 백혈구의 기능에 대한 좀 더 자세한 연구가 가능해졌다 (Fig. 3). 또한 신장조직으로부터 특정 백혈구를 분리한 후 in vitro culture system에서 여러 염증성 매개물질을 측정함으로서 염증세포의 시간에 따른 기능의 변화 등을 평가하는 것이 가능하다 (Fig. 4).

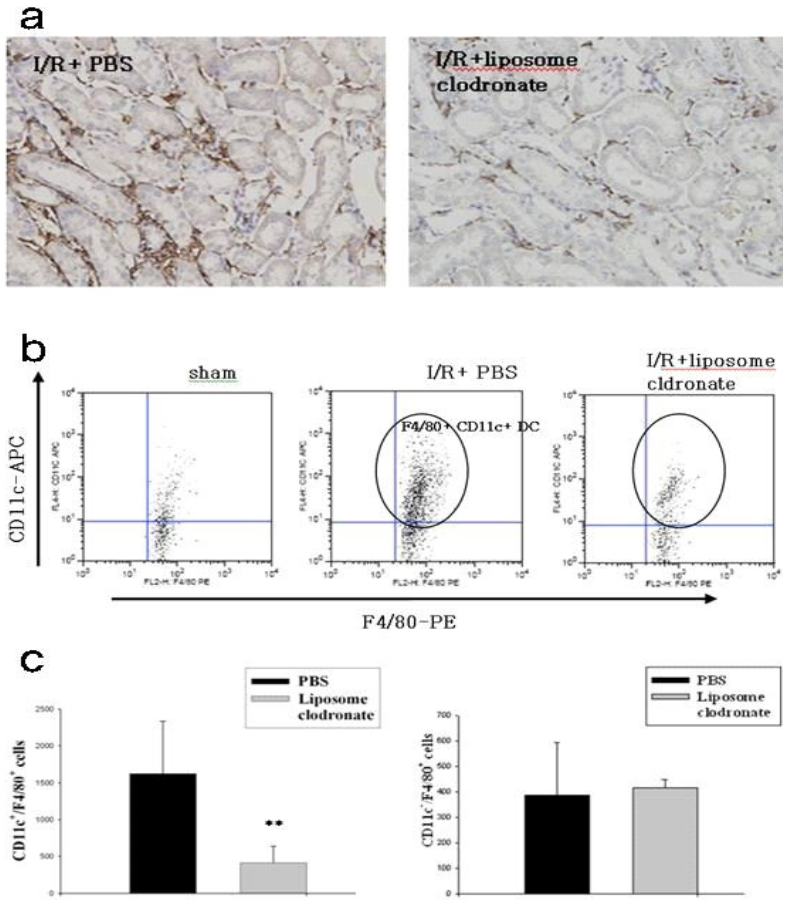
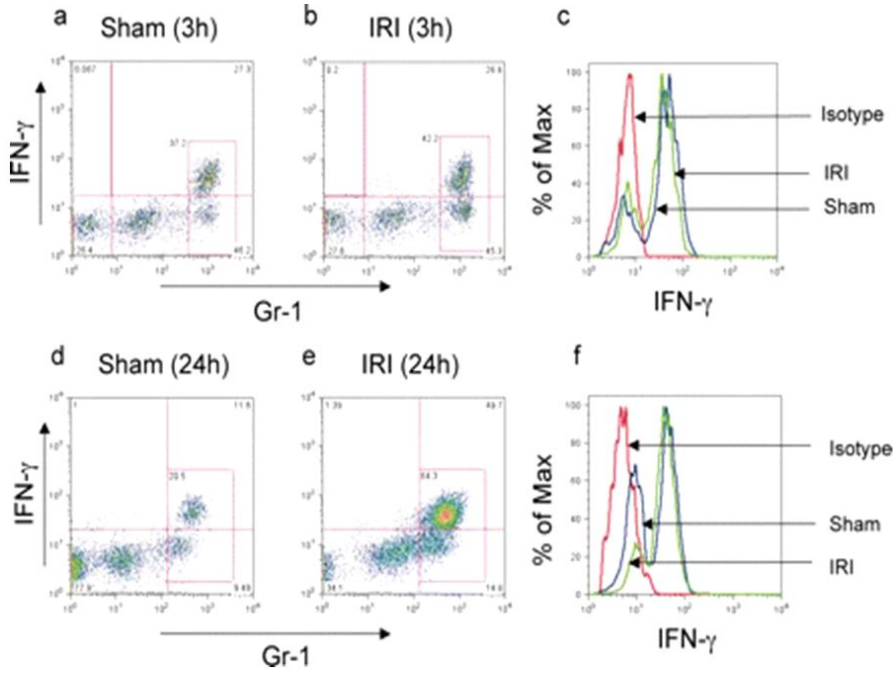


Fig. 2. Examples of differentiation of F4/80$^+$ CD11c$^+$ kidney dendritic cells from F4/80$^+$ CD11c$^-$ macrophages. (a) Liposome clodronate injection after I/R resulted in depletion of F4/80$^+$ cells in kidney, left : I/R+PBS day 7, right : I/R+liposome clodronate day 7, immunohistochemistry, ×200. (b) Flow cytometric analysis demonstrated that liposome clodronate preferentially depleted F4/80$^+$ CD11c$^+$ kidney dendritic cells. (c) Left : total number of F4/80$^+$ CD11c$^+$ kidney dendritic cells in PBS or liposome clodronate treated animals, right : total number of F4/80$^+$ CD11c$^-$ kidney macrophages in PBS or liposome treated animals. $^{**}p<0.05$ compared with PBS.



Li et.al. *J Immmunol*, 2007

Fig. 3. Intracellular staining of IFN-γ in kidney leukocytes. Kidney single cell suspensions were treated by mAb to CD45, AAD and Gr-1 (surface staining) and then fixed with 2% paraformaldehyde. After washing, cells were permeabilized with permeabilization buffer (eBioscience, USA) and then incubated with mAb to mouse IFN-γ. At 3, 24 hrs following I/R, Gr-1+ neutrophils produce IFN-γ.

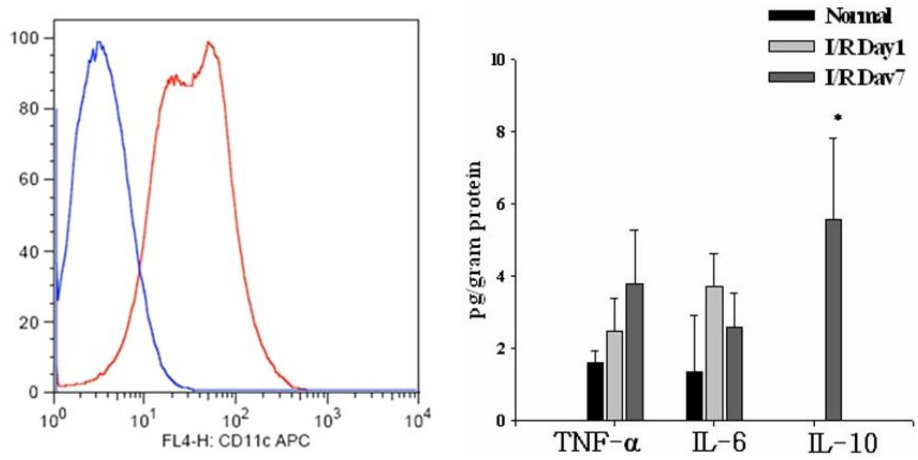


Fig. 4. Examples of CD11c$^+$ kidney dendritic cell isolation and measurement of cytokine production in different time point following I/R. CD11c$^+$ kidney DCs were isolated from mouse kidneys obtained on days 1 or 7 after reperfusion or from a sham operation. Briefly, the kidney suspension was digested with type IV collagenase and DNAse at 37℃ for 20 min and then subjected to 10 min of centrifugation at 40 g. The non-parenchymal cells were recovered from the supernatants and were further purified by density centrifugation using Ficoll at 1,000 g for 20 min. The low density interface cell fraction was collected, passed through a cotton column treated with 10% FBS, and washed with PBS. The final cell suspension was incubated with anti-mouse CD11c- coated magnetic beads (Miltenyi Biotech, Bologna, Italy) and then positively selected, isolating the CD11c$^+$-enriched cell population. The purity of the CD11c$^+$ cells were identified using flow cytometry (>90%). Isolated kidney CD11c$^+$-enriched cell populations at different reperfusion times were incubated in 96-well plates overnight and cytokine and chemokine concentrations in the supernatants were analyzed using cytometric bead array (CBA). (a) Histogram of CD11c- and CD11c$^+$ cell fractions following MACS using CD11c coated magnetic bead. (b) Results of cytokine secretion from CD11c$^+$ kidney dendritic cells at day 1 and day 7 following I/R. Significantly higher level of IL-10 secretion from CD11c$^+$ DC from day 7 reperfused kidney than that from day 1 reperfused kidney was observed, suggesting the phenotypical conversion of kidney DC from proinflammatory to anti-inflammatory in recovery phase of AKI.