

허혈-재관류 손상을 받은 백서의 신장 조직에서  
cyclosporine A와 mycophenolate mofetil에  
의한 heat shock protein70의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

김 미 혜

허혈-재관류 손상을 받은 백서의 신장 조직에서  
cyclosporine A와 mycophenolate mofetil에  
의한 heat shock protein70의 발현

지도 조 남 천 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 7월 11일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 미 혜

# 김미혜의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 조 남 천 

심사위원 정 운 규 

심사위원 박 기 영 

연세대학교 대학원

2001년 7월 2일

## 감 사 의 글

먼저 오늘이 있기까지 격려해 주신 어머니와 큰어머니께 감사 드리며 바쁘신 중에도 이 논문을 완성하기까지 세심한 지도로 이끌어 주신 박주영 교수님, 정윤규 교수님, 조남천 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 본 논문의 기회를 마련해 주신 최승욱 선생님과 본 논문의 전 과정에 걸쳐 협조해 주신 비뇨기과 송기학 선생님께 충심으로 사의를 표합니다.

# 차 례

그림 및 표 차례	i
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 실험대상 및 방법	5
1. 실험 대상 및 일반적 처치	5
2. 면역 조직 화학 염색	6
3. 영상 분석을 통한 면역 강도의 측정	6
4. 통계 분석	6
III. 실험 결과	7
1. 면역 조직 화학염색	7
2. 면역강도의 측정	7
3. 허혈-재 관류 손상군에서의 시간 경과에 따른 HSP70의 발현	10
4. 각 실험군에서의 HSP70 발현비교	10
IV. 고찰	12
V. 결론	16
참고문헌	17
영문요약	22

## 그림 및 표 차례

### 그림 차례

Fig. 1. Light microscopic appearance of Sprague-Dawley rat kidney after immunohistochemical stain. . . . .	8
Fig. 2. The change of HSP70 expression in ischemia-reperfusion group in course of time. . . . .	9
Fig. 3. Optical intensity of HSP in each experimental group. . . . .	11
Fig. 4. Comparison of optical intensity of HSP70 in groups of using drugs. . . . .	11

### 표 차례

Table 1. Optical intensity of HSP70 immunohistochemical stain in Sprague-Dawley rat. . . . .	9
--	---

## 국문 요약

# 허혈-재관류 손상을 받은 백서의 신장 조직에서 cyclosporine A와 mycophenolate mofetil에 의한 heat shock protein70의 발현

Heat shock proteins(HSPs)는 세포 단위의 물리적, 생화학적 자극에 의한 세포 손상에 대해 세포를 보호하고 세포의 항상성을 유지 시켜주는 물질로 알려져 있다. HSPs는 그 분자량과 기능에 의해 몇 가지 소 그룹으로 분류되며 특히 HSP70은 신장 조직에 분포하여 열 손상, 허혈, 삼투성 자극, 산소 독성등에 의해 증가하여 열 내성을 갖게 함으로써 신장 세포의 손상을 최소화하는데 기여하는 역할을 한다.

1980년대를 지나면서 면역 억제제의 개발 및 이식술의 발전으로 장기 이식이 활발해지고 이후 cyclosporine A와 steroid의 병합 사용으로 장기 이식의 성공률이 크게 증가하였으나 면역 억제제의 사용에 있어 약제 자체의 신장 독성 때문에 사용 상의 제한 점이 문제가 되었다. 이러한 시점에서 최근 신장 조직 자체에 대한 독성은 없으며 신장이식 후 cyclosporine A를 대체할 만한 효과가 보고되고 있는 mycophenolate mofetil(MMF)이 개발됨으로써 면역 억제제 사용의 문제점을 해결할 수 있는 계기가 되고 있다.

본 실험에서는 허혈-재관류 손상을 일으킨 Sprague-Dawley rat의 신장 조직에서 cyclosporine A와 MMF의 사용 및 이들 약제를 병합 사용한 결과 일어나는 세포 내 변화에 대하여 면역 조직 화학염색을 통해 HSP70의 발현 정도를 평가함으로써 신 독성에 미치는 MMF와 cyclosporine A와의 상호관계 및 차이점에 대하여 알아보고자 하였다.

백서의 신장 조직을 이용하였고 우측 신장을 적출한 후 허혈-재관류 손상을

받지않은 좌측 신장을 적출하여 대조군으로 사용하였다. 실험군으로는 좌측 신장의 혈류를 차단한 후 재관류시킨 허혈-재관류 손상군 및 약물사용군으로 나누었고 약물사용군은 cyclosporine A와 MMF 및 두가지 약제를 병합 사용한 군으로 나누어 좌측 신장 조직을 얻은 후 면역 조직 화학염색을 하였고 영상 분석기를 통해 염색된 강도를 측정하여 각 실험 군에서 HSP70이 발현되는 정도를 판단하고 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조 군에 비하여 허혈-재관류 손상을 받은 군에서 HSP70의 발현이 증가하였다( $p < 0.05$ ).

2. 허혈-재관류 손상을 받은 군과 비교하여 약물을 사용한 군에서는 HSP70의 발현이 증가하여 유의할 만한 차이가 있었다( $p < 0.05$ )

3. 약제를 사용한 군에서는 cyclosporine A를 사용한 군과 MMF를 사용한 군을 비교하였을 때 HSP70의 발현 정도에는 유의 할 만한 차이는 없었다( $p > 0.05$ ).

4. 단독으로 cyclosporine A를 사용한 군과 약제를 병합 사용한 군 사이에는 오히려 병합 사용한 경우에 HSP70의 발현이 감소하였다( $p < 0.05$ ).

이상의 결과로 허혈-재관류 손상을 받은 신장 조직에서는 HSP70의 발현이 증가하여 조직 손상이 의심되었다. 약물을 병용한 경우 더 심한 조직 손상이 가능함을 알 수 있었고 신장 독성이 없다고 알려진 MMF에서도 HSP70이 증가하는 것으로 보아 세포 단위 손상의 가능성이 있음을 알 수 있었다.

---

핵심단어 : Heat shock proteins(HSPs), 허혈-재 관류 손상, cyclosporine A, mycophenolate mofetil.

# 허혈-재관류 손상을 받은 백서의 신장 조직에서 cyclosporine A와 mycophenolate mofetil에 의한 heat shock protein70의 발현

연세대학교 대학원 의 학 과

김 미 혜

## I. 서 론

말기 신부전 환자의 치료로서 장기 이식술 발전 및 장기 보존 방법의 향상을 바탕으로 하여 신장 이식이 활성화되었고 1980년대 이후 면역 억제제 개발의 결과로 신장 이식의 성공률이 괄목할 만한 성과를 이룬 것은 사실이다. 그러나 신장 이식술이 증가하는데 비하여 시술 중 허혈-재관류에 의한 결과로 발생하는 문제점을 최소화하는 치료는 아직 뚜렷한 성과를 거두고 있지는 못한 실정이다. 면역 억제제의 사용은 초기의 steroid사용 이후 cyclosporine A와의 병합 사용으로 한 단계 발전을 이루기는 하였으나 면역 억제제의 사용이 대부분 cyclosporine A와 FK 506에 의존하고 있고 약제 자체의 신장 독성이 사용량과 비례하여 나타나므로

이식 후 면역 억제제의 사용에 있어서 큰 제한점이 되며 아직 해결해야 할 과제로 남아 있다<sup>1-4)</sup>. 신장 수여자 뿐만 아니라 공여자의 연령도 늘어감에 따라 이러한 문제점이 더욱 중요한 부분을 차지하게 되었다. 최근 cyclosporine A와는 달리 신장 기능 자체에 대한 독성은 없다고 알려져 있으며 신장 이식 후 cyclosporine A의 사용을 대체할 만한 정도의 면역 억제 효과가 보고되고 있는 mycophenolate mofetil(MMF)이 개발되어 cyclosporine A 및 steroid와의 세가지 병합요법이 대두되면서 면역 억제제 사용의 제한적 문제점들을 해결할 수 있는 계기가 되고 있다<sup>5-9)</sup>.

Heat shock protein(HSP)은 세포 내 단백질이 변성되는 것을 막고 단백질 합성 과정 중 생기는 오차를 최소화하여 정상적인 단백질이 합성되도록 하며 또한 자극에 의해 이미 변성된 단백질은 빨리 제거 시킴으로써 세포가 정상적인 기능을 할 수 있도록 한다고 알려져 있고 같은 허혈성 자극을 받게 되더라도 먼저 적당한 열 손상을 가해 HSPs이 미리 생겨있는 경우 그렇지 않은 경우보다 허혈성 손상이 적은 것이 실험 결과 증명되기도 하였다<sup>10-17)</sup>. 이 중 특히 HSP70의 경우에는 신장 또는 심장 세포에 정상 상태에서도 소량 존재해 있다가 열 손상, 허혈, 염화수은 등의 중금속, gentamicin, 고 삼투성 자극등에 의해 증가하여 세포의 손상 정도를 최소화 하는데 도움이 된다고 알려져 있다<sup>16-20)</sup>. 실제로 여러 자극에 의한 HSP70의 연구는 많았으나 허혈에 의한 급성 신부전에서의 HSP70의 역할은 아직 명확하지는 않고 신장 독성을 갖는 약물과의 상호 연관성은 cyclosporine A 및 gentamicin등에 대한 것이 보고되었을 뿐이다<sup>20)</sup>.

본 실험에서는 신장 이식수술이 최선의 방법으로 인정되고 있는 현실에서 말기 신부전 환자의 치료로서 개발된 새로운 면역 억제제인 MMF와 기존에 의존하던 cyclosporine A와의 신독성의 차이를 HSP70을 이용하여 비교해 보고자 하였다.

## II. 실험 대상 및 방법

### 1. 실험대상 및 일반적 처치

#### 가. 실험대상

체중 230-330gm 사이의 Sprague-Dawley rat을 사용하였고(n=32) 성별에 따른 오차가 생길 수 있음을 고려하여 수컷만을 사용하였다.

#### 나. 신장조직의 적출

에테르를 사용하여 마취시킨 후 복부 절개하여 우측 신장을 제거하였고 이후에 좌측 신장을 적출하여 얻은 조직을 대조 군으로 설정하였다(n=4).

#### 다. 허혈-재관류 손상

같은 조건하에서 우측 신장을 제거한 후 좌측 신장의 혈관경을 결찰하여 60분간 허혈 손상을 준 후 다시 60분간 재관류 시켜 신장 조직의 색깔 변화를 관찰하여 재관류를 확인한 다음 각 1, 5, 7, 14일째 좌측 신장을 적출하였고(n=16) 이들 중 7일째 얻은 조직으로 다른 실험군과 비교하여 실험 하였다(n=4).

#### 라. 약제의 사용

같은 조건으로 허혈 재관류 손상을 준 후 cyclosporine A와 MMF를 각각 사용한 군 및 두 가지 약제를 같이 사용한 군으로 나누었다. 면역억제제는 매일 투여하였으며 약물투여 7일째 좌측 신장을 적출하였다. Cyclosporine A를 사용한 군(n=4)은 25mg/kg/day의 용량으로 피하 주사하였으며 MMF를 사용한 군은 같은 조건아래 10mg/kg/day의 용량으로 경구로 투여 하였다(n=4). 두 가지 약물을 병용한 군은 같은 용량으로 동시에 투여하였다(n=4).

## 2. 면역 조직 화학 염색

위의 과정에서 얻은 신장 조직은 즉시 10% formalin용액으로 6시간 동안 고정하였고 고정된 조직을 물로 수세하여 탈수과정을 거친 후 파라핀에 포매하여 4  $\mu$ m의 두께로 절편을 만들어 사용하였다. 100% xylene을 사용하여 5분간 파라핀을 제거한 후 각 3분씩 100%, 90%, 75% 알코올로 재수화 하였고 0.05M의 phosphate buffered saline(PBS)로 10분간 세척 후 1% 과산화수소수로 10분간 반응시켜 내인성 과산화수소수를 억제 시킨 다음 다시 PBS로 10분간 세척하고 조직둘레를 잘 닦은 후 일차 항체(a goat monoclonal Ab against HSP70, anti-HSP70 Ab. Stressen. Victoria BC. Canada)를 떨어뜨려 4℃에서 하루동안 반응 시켰다. 다음 날 PBS으로 세척한 후 biotin과 결합한 항체인 이차항체(Vectastatin Diluted anti-mouse IgG Biotinylated Ab, Burlingame. CA. USA)를 사용하여 2시간 반응 시켰고 다시 PBS로 5분간 세척한 후 ABC용액으로 1시간 30분, PBS 용액으로 10분간 세척하고 나서 diaminobenzidine tetrahydrochloride용액으로 4분간 발색을 강화 시켰다. PBS및 흐르는 물에 수세하여 cover slip을 덮고 관찰하였다.

## 3. 영상 분석(Image analysis)을 통한 면역 강도의 측정

면역 조직 화학 염색된 조직을 영상 분석기(iNtRON<sup>®</sup> Digital CD camera)를 사용하여 HSP70의 염색 강도(optical intensity)를 측정하였다.

## 4. 통계 분석

SPSS를 사용하여 Mann-Whitney 검정으로 판단하였고 p값이 0.05 보다 작은 경우(0.05미만)에 의미가 있는 것으로 간주하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 면역 조직 화학 염색

각각의 실험군에서 얻은 조직으로 면역 조직 화학 염색을 하였을 때 대조군에서도 다소 갈색으로 보이는 HSP70의 발현 부위가 관찰 되었고 허혈-재관류 손상을 받은 실험군에서는 갈색으로 염색된 HSP70의 발현 부위가 더 증가하였다. 약제를 사용한 실험군에서는 허혈-재관류 손상을 주었을 때 보다 더 강하게 갈색으로 염색되는 부위를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

#### 2. 면역 강도의 측정

허혈-재관류 손상이 없는 대조군에서는 최소 면역 강도 115.00에서 최대 120.00으로 평균값은  $117.75 \pm 2.22$ 였으며 허혈-재관류 손상을 받은 실험군에서는 면역 강도 121.00에서 130.00까지의 분포로 평균값  $125.75 \pm 4.92$ 이었다. Cyclosporine A를 사용한 실험군에서는 면역 강도 135.00에서 138.00의 분포의 평균값  $136.75 \pm 1.3$ 정도로 가장 강하게 HSP70이 발현되었고 MMF를 사용한 실험군에서는 면역 강도 132.00에서 140.00의 분포로 평균값  $136.25 \pm 3.0$ 의 결과로 나타났다. 두 가지 약제를 같이 사용한 실험군에서는 면역 강도 130.00에서 135.00으로 분포되어 평균값  $132.50 \pm 2.1$ 의 결과를 보였다(Table 1).

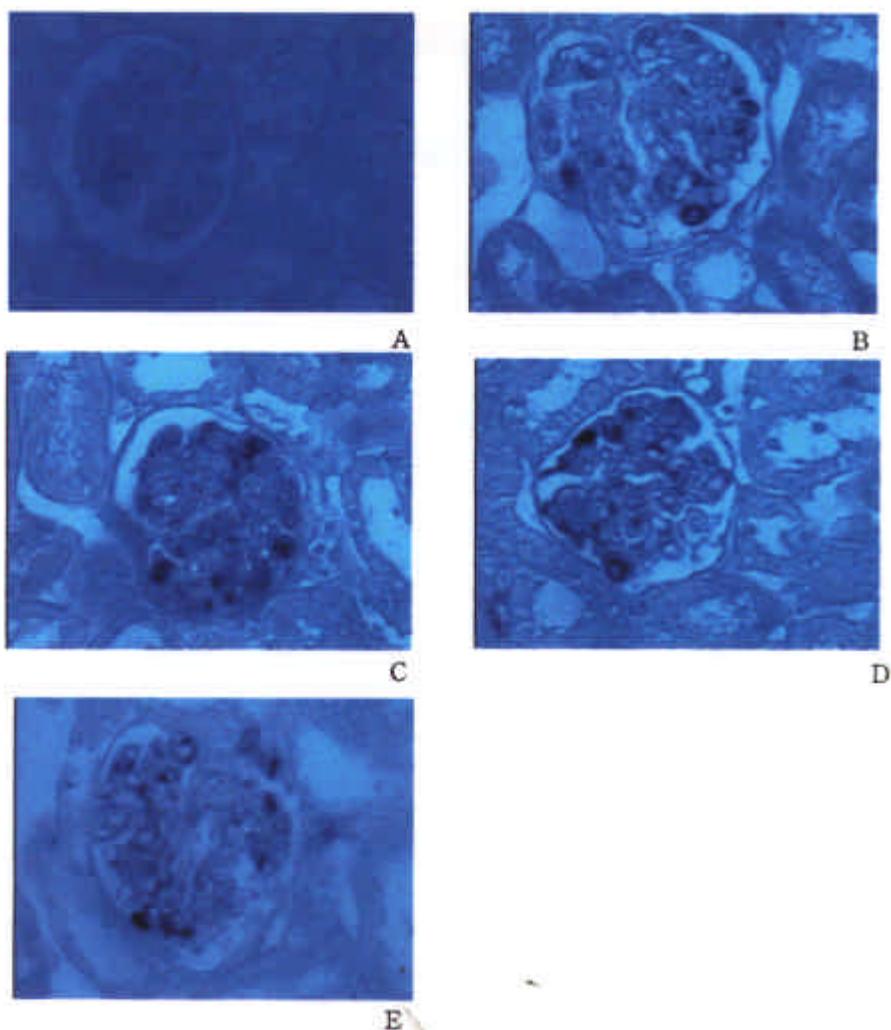


Fig. 1. Light microscopic appearance of Sprague-Dawley rat kidney after immunohistochemical stain. A: Control group. Back ground is staining with blue color and brown colored region is localized HSP70 expression. B: Ischemia-reperfusion group. Brown colored region of HSP70 expression is increased compared to control group. C: HSP70 expression is much increased in group of cyclosporine A. D: HSP70 expression is increased in group of MMF. E: HSP70 expression in group of both drugs.

Table 1. Optical intensity of HSP70 immunohistochemical stain in kidney of Sprague-Dawley rats

	n	Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD
Control	4	115.00	120.00	117.75 $\pm$ 2.22
I-R	4	121.00	130.00	125.75 $\pm$ 4.92
CsA	4	135.00	138.00	136.75 $\pm$ 1.25
MMF	4	132.00	140.00	136.25 $\pm$ 3.30
CsA+MMF	4	130.00	135.00	132.50 $\pm$ 2.08

Control :right unilateral nephrectomized Sprague-Dawley rats. I-R :ischemia-reperfusion injured group in left kidney after right unilateral nephrectomy. CsA :cyclosporine A(25mg/kg) was injected subcutaneously after ischemia reperfusion injury. MMF: mycophenolate mofetil(10mg/kg) was given orally after ischemia reperfusion injury. CsA+MMF: both drugs were given after ischemia-reperfusion injury. Mean  $\pm$  SD :mean optical intensity  $\pm$  standard deviation.

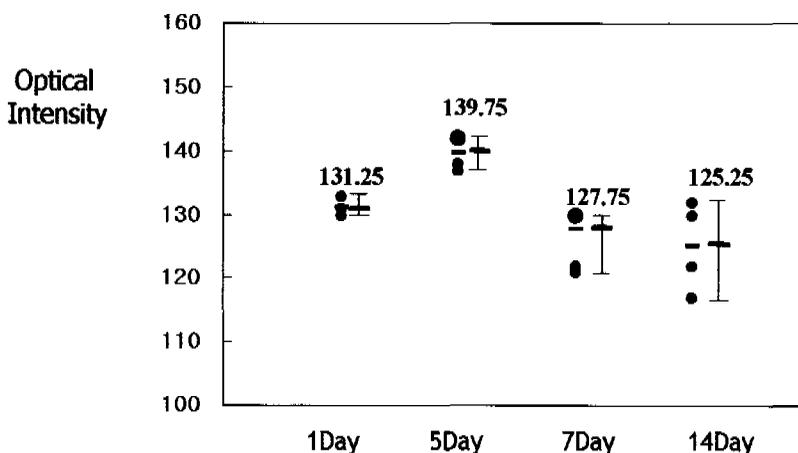


Fig. 2. The change of HSP70 expression in course of time of ischemia-reperfusion group. Optical intensity of HSP70 was observed on the 1st, 5th, 7th, 14th day.

### 3. 허혈-재관류 손상군에서의 시간 경과에 따른 HSP70의 발현

허혈-재관류 손상을 준 후 각각 1, 5, 7, 14일째 얻은 조직에서 시간에 따른 HSP70의 발현정도를 관찰한 결과 허혈-재관류 손상 후 5일째 발현 강도 139.75로 가장 높았고 이후 7일과 14일에는 각각의 평균값이 127.75 및 125.25로 감소하여 변화가 관찰 되지 않았다(Fig. 2).

### 4. 각 실험 군 사이의 HSP70의 발현 비교

실험 결과 신장 조직의 허혈-재관류 손상이 없는 대조군(발현강도 117.75)에 비하여 허혈-재관류 손상이 있었던 군에서는 평균 발현 강도가 125.75로 증가되었다( $p=0.020$ ). 약물을 사용한 실험군과 비교할 때 Cyclosporine A, MMF, 두가지 약제를 사용한 실험군 모두에서 대조군에 비하여 HSP70의 발현 강도가 증가하여 의미있는 차이를 보였다. 허혈-재관류 손상군과 약물 사용군을 비교하였을 때 손상 후 cyclosporine A를 사용한 군에서는 HSP의 발현정도가  $p=0.019$ 로 의미있는 차이를 보였고 MMF를 사용한 군과의 비교에서도  $p=0.020$ 으로 차이가 있는 것으로 나타났다. 또한 두가지 약제를 같이 사용한 군과의 비교에서는  $p=0.038$ 로 역시 차이는 있는 것으로 나타났다(Fig. 3).

Cyclosporine A를 사용한 군과 MMF를 사용한 군 사이에서는  $p=0.767$ 로 HSP70의 발현되는 정도의 차이가 없었다. Cyclosporine A와 MMF를 같이 사용한 군에서는 평균 면역 강도 132.50으로 약물 사용 군 중에서는 HSP70의 발현이 가장 적었고 cyclosporine A만을 사용한 군과 비교 하였을 때  $p=0.028$ 로 의미 있는 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 약물을 같이 사용한 군과 MMF만을 사용한 군과의 비교에서는  $p=0.110$ 정도로 나타났다(Fig. 4).

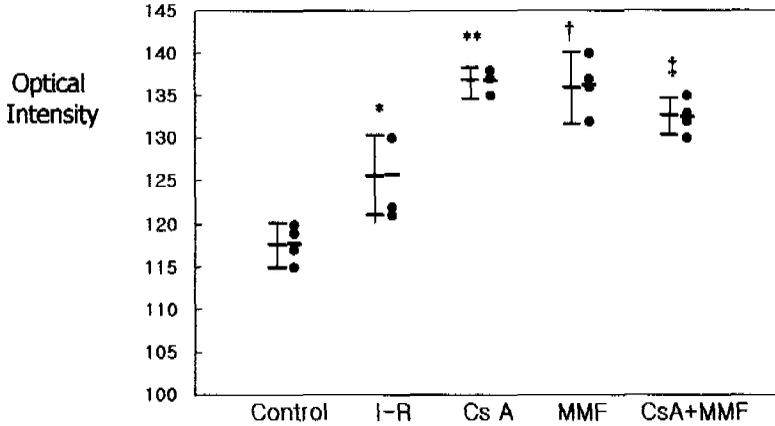


Fig. 3. Optical intensity of HSP70 in each group. I-R: ischemia-reperfusion injury, CsA: cyclosporine A, MMF: mycophenolate mofetil. CsA+MMF: cyclosporine A+mycophenolate mofetil. Optical intensity of HSP expression is increased in I-R, CsA, MMF, and CsA+MMF group in comparison with control group (\* $p=0.020$ , \*\* $p=0.020$ , † $p=0.021$ , † $p=0.021$ ). HSP70 expression is increased in CsA, MMF, CsA+MMF group in comparison with I-R group ( $p=0.019$ ; I-R vs. CsA,  $p=0.020$ ; I-R vs. MMF,  $p=0.038$ ; I-R vs. CsA+MMF).

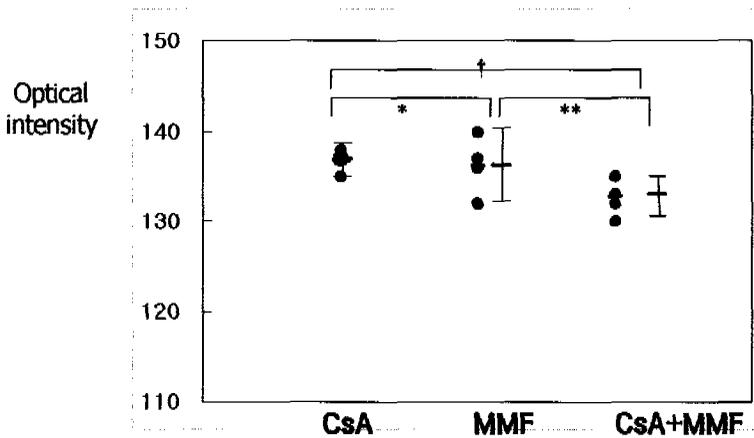


Fig. 4. Comparison of HSP70 expression in CsA, MMF, CsA+MMF group. CsA: cyclosporine A, MMF: mycophenolate mofetil, CsA+MMF: cyclosporine A+mycophenolate mofetil (\* $p=0.767$ ; CsA vs. MMF, † $p=0.028$ ; CsA vs. CsA+MMF, \*\* $p=0.110$ ; MMF vs. CsA+MMF)

#### IV. 고 찰

Heat shock proteins(HSPs)은 세포에 손상을 줄 수 있는 자극이나 환경에 대해 세포 내에서 일어나는 일반적인 적응반응 중 생성되는 물질로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 이 HSPs의 기능은 크게 두가지로 나누어 볼 수 있는데 첫째 molecular chaperone 기능으로 단백질 합성 과정 중의 부착, 조합, 또는 전위 등의 과정 중에 일어날 수 있는 오류를 최소화 하고, 둘째 세포질에서의 ubiquitin-dependent degradation 과정 중의 주요 구성성분으로서 변성된 단백질의 파괴에 중요한 역할을 한다<sup>10,11,21,22)</sup>. 이 단백질은 그 기능과 분자량에 따라 HSP60, HSP70, HSP90, HSP110 및 저 분자량을 갖는 HSP23-30등 여러 가지 소 그룹으로 분류되는데 손상된 자극을 받은 세포뿐만 아니라 정상 세포에서도 관찰되는 경우도 있다<sup>10,11,19,22)</sup>.

일반적으로 세포 손상 후 생겨난 변성된 단백질이 증가함으로써 비활성화 형태로 존재하던 heat shock elements(hse)들이 활성화되는데 이 물질이 heat shock gene을 활성화 시키는 전구체의 역할을 하므로 결국 HSPs이 증가한다는 것이 일반적으로 알려진 기전이다<sup>21)</sup>. HSPs는 세포의 생존에 있어 세포의 항상성을 유지하여 세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있고 다양한 생리적 자극과 관련이 있으며 노화 발생의 기전 및 세포의 발생학적인 측면에도 영향이 있는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. HSPs를 증가시키는 자극 원으로는 열 손상, 중금속, 고 삼투성 자극 및 허혈 손상, 포도당 결핍, 산소 독성 등이 있다<sup>11,23)</sup>. 특히 HSP70및 HSP25 등은 열손상, 허혈, 고 삼투성 자극, 산소 독성 등의 자극에 의해 신장세포 내에서 증가되는데 각 부위에 따라 그 분포가 다르며 특히 HSP70은 허혈 손상의 시간에 따라 내측 수질 부위에서 증가한다고 입증된 바 있다<sup>18,24,25)</sup>. 본 실험에서는 허혈-재관류 손상이후 5일째 가장 높은 HSP70의 발현을 보이고 손상받지 않은 수준으로 회복 되지는 않으나 7일 이후에는 감소하여 큰 변화가 없는 것으로 나타났다<sup>12,18,26-28)</sup>. 또한 대조군에서보다 허혈-재관류 시킨 군에서 HSP70의 발현이 증가한 것으로 보아 허혈-재관류에 의한 신장 조직의 손상을 생각할 수 있었고 단순히 허혈-재관류시킨 실험군에서보다 약제를 사용하여 실험한 군에서 HSP70의 발현

이 증가하여 신장 조직의 손상이 더욱 심화된 것을 알 수 있었다. 이 HSP의 역할에 대해서는 신 세뇨관 세포에 허혈성 손상을 주어 실험한 경우에서 HSP의 형성이 세포의 손상을 방어하지는 못한다는 반론도 제기된 바 있으나 현재 대체적으로 허혈-재관류 등의 자극에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 역할을 한다고 믿어지고 있고 그 증거로 심장의 관상동맥 혈관의 내피세포에서도 전 처치를 하여 HSP70을 증가시킨 경우에 그렇지 않은 경우보다 허혈 손상이 적게 일어난다는 보고 뿐만 아니라 간 세포 및 피부 이식 과정에서도 비슷한 결과가 나타남이 보고되고 있다<sup>12,13,17,26-28</sup>).

본 실험에서는 대조군에서 보다 허혈-재관류 시킨 군에서 HSP70의 발현이 증가한 것으로 보아 허혈-재관류에 의한 신장 조직의 손상을 생각할 수 있었고 단순히 허혈-재관류 시킨 군에서 보다 약물을 사용하여 실험한 군에서 HSP70의 발현이 증가한 것으로 보아 신장 조직의 손상이 더 심화된 것을 추측할 수 있었다.

여러 실험을 통해 cyclosporine A와 HSP70과의 관계에 대한 연구도 이루어졌는데 먼저 적당한 열 손상을 주어 미리 HSP70을 증가시켜 놓은 다음 cyclosporine A를 사용한 군과 처음부터 cyclosporine A를 사용한 군을 비교하였을 때 표현된 HSP70이 증가할 수록 cyclosporine A에 의한 세포 손상이 감소함을 보여 HSP70의 신장보호 기능이 알려졌고 또한 cyclosporine A를 주었을 때 HSP70의 유전자 표현이 증가함이 실험을 통해 알려진 바 있다<sup>14,29,30</sup>. 1980년대 이후 장기 이식수술이 활발해지고 면역 억제제의 사용이 신장 이식 후의 성공률에 큰 영향을 주고 있어 cyclosporine A의 신장 독성이 문제가 되었고 그 결과 사용상의 제한 점을 해결하기 위하여 cyclosporine A 및 FK506에 의존하지 않는 새로운 대체 약물들이나 cyclosporine A의 독성을 약화시키는 약제의 개발이 연구되고 있다<sup>31</sup>.

Cyclosporine A와 FK 506은 그 구조는 다르지만 면역 억제제의 기전에 있어서 비슷한 역할을 하는데 이들 약물은 세포 내 결합 단백질인 immunophilin과 결합하여 T-림파구의 활성화를 억제함으로써 면역 억제제의 작용을 나타낸다. Cyclosporine A는 cyclophilin과 결합하고 FK506은 FKBP12와 결합하여 약물-단

백 복합체를 형성하여 이 물질이 선택적으로 calcineurin이라는 단백 인산효소제 (protein phosphatase)의 활성을 억제함으로써 T-세포 활성화 유전자의 전사과정을 차단하여 면역 억제의 효과를 나타낸다<sup>32,33</sup>.

Calcineurin과 관련하여 면역 억제 반응을 나타내는 약물은 신장 독성이 있는 것으로 알려져있고 cyclosporine A의 경우에는 그 사용량에 비례하여 신장 독성이 나타나는데 신 혈류량의 감소 및 사구체 여과율 감소, 혈중 크레아티닌의 증가 및 고혈압의 악화, 신장 혈관의 손상 등이 올 수 있으며 신장독성 이외에도 간 독성, 신경 독성, 치주비대, 다모증, 악성종양의 발생 및 당뇨병 발생의 위험이 있어 그 사용상의 문제가 심각하다<sup>34,34-36</sup>.

이에 반하여 1995년 이후 개발된 MMF와 sirolimus는 신장 독성이 없다고 보고 되고 있는데 이들 약물은 immunophillin과는 반응하지 않고 특히 MMF는 cyclosporine A보다 훨씬 이후의 단계 즉 이미 형성된 T-임파구의 활성화를 제한하여 면역 억제의 효과를 나타내고 퓨린 합성과 관련된 것으로 알려져 있다<sup>5,6</sup>. MMF는 90년대 초부터 연구되기 시작하여 1995년 미국에서 승인된 후 신장 이식 후에 cyclosporine A와 함께 사용되었고 1998년에는 심장 이식 후의 면역 억제 효과가 인정되어 최근 각광을 받고 있는 약제로 sirolimus와 MMF는 직접적인 신장 독성은 없다고 알려져 있으며 이중 sirolimus는 spontaneous hypertensive rat(SHR)에서 발생하는 신장 병변을 가속화 시킬 수 있다는 보고만이 되었을 뿐이고 MMF의 경우 사용 시 위장관 장애 및 혈액학적 이상소견이 있을 수 있다는 정도로만 보고되고 있다<sup>2,6,37,38</sup>.

이렇게 MMF가 소개된 이후 약물의 효과와 신장 이식 후의 사용법 등에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 신장 이식후 cyclosporine A를 사용하다가 점차 사용량을 줄여 MMF로 바꾸어 사용하여도 면역 억제 효과를 유지하면서 cyclosporine A의 신장 독성을 줄일 수 있다는 장점이 여러차례 보고되었고 FK506과 같이 병용하는 경우 cyclosporine A와 같이 사용하는 경우보다 면역 억제의 효과가 더 강력하다고 보고된 바 있다<sup>7-9,15,39</sup>. 또한 이미 cyclosporine A에 의해 신장 독성이 나타난 경우에도 MMF로 바꾸어 사용하여 성공적인 결과를 얻었고 동물 실험상 그 기전은 명확하지 않으나 MMF가 혈관 평활근의 증식을 억제

한다는 연구결과도 있다<sup>6,40)</sup>. 본 실험에서 cyclosporine A를 사용했을 때 HSP70의 발현의 증가는 예상한 결과였으나 신 독성이 없다고 알려진 MMF를 사용한 군에서도 HSP70의 발현이 증가한 것은 예상하지 못했던 일이다. 또한 cyclosporine A를 사용한 군과 비교하였을 때 HSP70의 발현의 차이가 없는 것으로 나타난 것은 허혈 손상을 받은 신장 조직에 있어서의 MMF의 사용이 cyclosporine A의 사용과 마찬가지로 신장의 세포 단위에서는 손상을 줄 수 있을 가능성도 있다. 비록 MMF를 사용하는 것이 전체적인 신장 기능에 영향을 미치지 않는 것이 여러 연구결과 밝혀졌지만 본 실험 결과로는 적어도 MMF자체가 세포단위에서 자극을 받는다는 것은 추측 할 수가 있다. 또한 면역 억제의 측면에서 볼 때 MMF의 면역 억제효과에 의해 생기는 이차적인 cytokine등의 변화에 따라 HSP70의 증가될 가능성도 있다고 볼 수 있어 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. MMF를 사용한 군에 있어서는 실험군 중 염색 강도의 표준 편차가 큰 편으로 실험상의 오차를 생각 할 수 있으나 면역 강도범위의 최대값 및 최소값의 분포가 뚜렷한 차이를 보이므로 MMF에 의한 HSP70의 증가는 명확한 것으로 볼 수 있다. 또한 두 가지 약제를 같이 사용한 군과의 비교에서 볼 때 cyclosporine A만을 사용한 군과는  $p < 0.05$ 의 유의할 만한 차이로 HSP70의 발현이 감소되었는데 두 가지 약제를 같이 사용한 경우에 있어서 다른 기전으로 인하여 HSP70의 표현이 감소하는가에 대하여는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각되고 MMF만을 사용한 실험군과 두 가지 약물을 병용한 실험군 사이에서도  $p = 0.110$ 정도의 결과를 보여 전혀 유의할 만한 차이가 없다고 판단 할 수는 없으며 실제로 임상에서는 신장이식 후 장기간의 면역 억제제를 사용해야하므로 MMF의 신장 독성에 대한 작용은 좀더 장기간의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

HSP70은 여러 세포 자극에 대하여 세포의 항상성을 유지시켜줌으로써 세포 보호 작용을 하는 물질로 알려져 있다. 허혈-재관류 손상을 준 신장 조직에서의 cyclosporine A와 MMF의 영향을 면역 조직 화학염색을 통한 HSP70의 발현 정도로 알아보았고, 그 결과 정상 신장 조직에서보다 허혈-재관류 손상을 받은 조직에서의 HSP70의 발현이 증가하였으며, 또한 cyclosporine A와 MMF를 사용한 군에서 더 강한 HSP70의 발현이 관찰 되어 MMF의 사용이 cyclosporine A의 경우와 마찬가지로 세포 단위에서는 백서의 신장 조직에 손상을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Musio F, Carome MA, Bohlen EM, Sabins S, Yuan CM. Effect of glycines on cisplatin nephrotoxicity and heat shock protein70 expression in the rat kidney. *Renal Failure* 1997;19:33-46
- 2) Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of Immunosuppressive Drugs: Long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000;35:333-46
- 3) Myers BD. Cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1986;30:964-74
- 4) Barros EJJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987;32:19-25
- 5) Halloran PF. Molecular mechanism of new immunosuppressants. *Clin Transplant* 1996;10:118-23
- 6) Keunecke C, Rothenpieler U, Zanker B, Schneeberger H, Illner WD, Theodorakis J, Stangl M, Land W. Mycophenolate mofetil monotherapy: An example of safe nephrotoxicity/Atherogenicity-free immunosuppressive maintenance regimen in a selected group of kidney-transplanted patients. *Transplant Proc* 2000;32 Suppl 1A:6S-8S
- 7) Kaplan B, Ulf Meier-Kriesche HU, Vaghela M, Friedman G, Mulgaonkar S, Jacobs M. Withdrawal of mycophenolate mofetil in stable renal transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:1726-8
- 8) Zanker B, Schneeberger H, Rothenpieler U, Hillebrand G, Illner WD, Theodorakis I, Stangl M, Land W. Mycophenolate mofetil-based, cyclosporine-free induction and maintenance immunosuppression. *Transplantation* 1998;66:44-9

- 9) Peter JH, Gregoor S, Gelder T, Nicole MB, Barbara JM. Randomized study on the conversion of treatment with cyclosporine to azathioprine or mycophenolate mofetil followed by dose reduction. *Transplantation* 2000;70:143-8
- 10) Joseph P. Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993;62:349-84
- 11) Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experimentia* 1992;48:629-34
- 12) Schober A, Muller E, Thurau K, Beckz FX. The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischemia in different kidney zones. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1997;454:292-9
- 13) Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats : Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;128: 251-8
- 14) Yuan CM, Bohlen EM, Franco Musio, Carome MA. Sublethal heat shock and cyclosporine exposure produce tolerance against subsequent cyclosporin toxicity. *Am J Physiol* 1996;271(Renal Fluid Electrolyte physiology 40):F571-8
- 15) Schrama YC, Joles JA, Tol AV, Boer P, Koomans HA, Hene RJ. Conversion to Mycophenolate mofetil in conjunction with stepwise withdrawal of cyclosporine in stable renal transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:376-83
- 16) Manara GC, Sansoni P, De Giorgi LB, Gallinella C, Ferrari C, Brianti V, et al. New insights suggesting a possible role of a heat shock protein 70kD family related protein in antigen processing/presentation phenomenon in humans. *Blood* 1993;82:2865-71
- 17) Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, Ichikawa H, Shirakura R, Matsuda R. Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary

endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1129-36

18) Muller E, Neuhofer W, Ohno A, Rucker S, Thureau K, Franz-X. Heat shock proteins HSP25, HSP60, HSP72, HSP 73 in isoosmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1996;432:608-17

19) Venkatasehan VS, Marquet E. Heat shock Protein 72/73 in normal and diseased kidneys. *Nephron* 1996;73:442-9

20) Komatsuda A, Wakui H, Satoh K, Yasuda T, Imai H, Nakamoto Y, Miura AB, Itoh H, Tashima Y. Altered localization of 73-Kilodalton Heat shock protein in rat kidneys with Gentamicin-induced acute tubular injury. *Lab Invest* 1993;68:687-95

21) Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 1991;66:191-7

22) Chiang HL, R Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989;246:382-5

23) Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995;95:3-12

24) Polla BS. A role for heat shock proteins in inflammation. *Immunol Today* 1988;9:134-7

25) Perdrizet GA, Kaneko H, Buckley TM, Fishman MS, Pleau M, Bow L, Schweizer RT. Heat Shock and recovery protects renal allografts from warm ischemic injury and enhances HSP72 production. *Transplant Proc* 1993;25:1670-3

26) Joannidis M, Cantley LG, Spokes K, Medina R, Pullman J, Rosen S, Epstein FH. Induction of heat shock proteins does not prevent renal tubular injury following ischemia. *Kidney Int* 1995;47:1752-9

27) Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis

VL. Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992;90:659-64

28) Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circulation Research* 1988;63:543-9

29) Paslaru L, Rallu M, Manuel M, Davidson S, Morange M. Cyclosporin A induced and atypical heat shock response. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;269:464-9

30) Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. *Am J Physiol*. 1991;260(Renal Fluid Electrolyte Physiol 29):F479-85

31) Khader AA, Sulaiman MA, Kishore PN, Moris C, Tariq M. Quinacrine attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 1996;62:427-35

32) Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13:136-42

33) Nevins TE. Overview of new immunosuppressive therapies. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:146-50

34) Thomson SC, Tucker BJ, Gabbai F, Blants BC. Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J Clin Invest* 1989;83:960-9

35) Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990;37:1487-91

36) Vincenti F, Ramos E, Nashan B, Stuart F, Vanrenterghem Y, Brattstrom D, et al. Preliminary results of the combined use of humanized anti-IL-2R $\alpha$  monoclonal antibody, daclizumab(DZB) and mycophenolate mofetil(MMF) without calcineurin inhibitor in renal transplantation.

Transplantation 1998;266 suppl 1:65S

37) Versluis DJ, Wenting GJ, Derkx FHM, Schalekamp MADH, Jeekel J, Weimar W. Who should be converted from cyclosporine to conventional immunosuppression in kidney transplantation, and why. Transplantation 1987;44:387-9

38) Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. Immunopharm 2000;47:215-45

39) Glanemann M, Klupp J, Langrehr JM, Schroer G, Platz KP, Stange B, Settmacher U, Bechstein WO, Neuhaus P. Higher Immunosuppressive efficacy of mycophenolate mofetil in combination with FK506 than in combination with cyclosporin A. Transplant Proc 2000;32:522-3

40) Shaheen FAM, Sheikh IA. Use of mycophenolate mofetil in renal transplants with cyclosporin toxicity. Transplant Proc 1999;31:3294

## ABSTRACT

### Up-regulation of heat shock protein70 by cyclosporine A and mycophenolate mofetil in ischemia-reperfusion injury of rats kidney

*Mi Hye Kim*

*Department of Medical Science The Graduate School*

*Yonsei Wonju medical University*

*(Directed by professor Nam Cheon Cho)*

With the development of new immunosuppressive agents, the focus of anti-rejection therapy has shifted from prevention of acute rejection to an immunosuppressive approach with minimal toxicity. Cyclosporine A and corticosteroids all have adverse effects such as nephrotoxicity, diabetes mellitus and lymphoproliferative disorder. As a new immunosuppressive agent having a different mechanism, mycophenolate mofetil(MMF) emerged for clinical trials in the early 1990s.

The 70kD heat shock protein is expressed significantly in the cell under normal state and is considerably induced under stressful conditions. The heat

shock response is a highly conserved response of cells to a variety of stresses, which are induced under pathophysiological conditions, such as embryonic development, cell differentiation, toxin exposure, and oxidative stress. This paper focuses on nephrotoxic effect of MMF at cellular level. Male Sprague-Dawley rats were randomized and divided into 5 groups. In group A(n=4), right nephrectomy was performed only and group B(n=4) was injured by ischemia-reperfusion insult in left kidney after right nephrectomy. The rats in group C,D,E received cyclosporine A(25mg/kg, subcutaneous injection ;group C(n=4)), and received MMF(10mg/kg, per oral ;group D(n=4)) and both drugs(cyclosporine A 25mg/kg plus MMF 10mg/kg ;group E(n=4)) daily for 1 week.

Expression of HSP70 after ischemia-reperfusion injury was studied in the course of time(n=16). After ischemia-reperfusion injury, the rats were sacrificed on the 1st, 5th, 7th, and the 14th day. Maximal accumulation of HSP70 in rat tissue occurred on the 5th day after ischemia-reperfusion injury.

Immunological staining shows an increased expression of HSP70 in use of MMF as well as cyclosporine A. This paper reports that MMF acts as a cell damaging stressor in renal tissue of Sprague-Dawley rats.

---

Key words : Mycophenolate mofetil, cyclosporine A, heat shock proteins,  
ischemia-reperfusion injury.