방사선 조영제 유발 신병증에서 phosphodiesterase 5 길항제 와 N-acetylcysteine 이 나타내는 신장 보호 효과와 그 상승작용

연세대학교 대학원

의학과

유 종 명

방사선 조영제 유발 신병증에서 phosphodiesterase 5 길항제 와 N-acetylcysteine 이 나타내는 신장 보호 효과와 그 상승작용

지도교수 최 승 옥

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2011년 1월 일

연세대학교 대학원

의학과

유 종 명

유종명의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2011년 1월 일

감사의 글

연구 계획서를 작성할 때만 해도 가볍고 단순한 호기심에 가까운 마음으로 시작했던 연구가 만성 신부전증의 동물모델 만들기의 잇따른 실패, 백서에서의 효과적인 채혈법과 정맥로 확보의 어려움, 대사 상자를 관리할 때의 체력적인 부담, mRNA 와 단백질 정량 때의 수 많은 시행착오 등의 난관에 부딪히면서, 부담스럽고 때로는 포기하고 싶은 난제가 되어 갔습니다. 그러나 양재원 선배님의 도움으로 백서 관리와 수술에 필요한 기분 술기를 익히고, 최승옥 교수님과 한병근 교수님의 배려로 여유 있게 연구실 공간과 실험 기자재를 사용할 수 있게 되면서 한결 쉽게 연구를 진행할 수 있었습니다. 특히 mRNA 와 단백질의 추출과 정량 과정에서 착오가 생길 때마다, 열정적이고 아낌없는 조언으로 문제를 해결할 수 있게 도와준 중앙연구실 여러 동료 연구자들은 제게 큰 힘이 되었습니다. 그리고 생리학 교실 차승규 교수님의 예리한 지적과 조언은 연구과정과 논문작성법 상에 산재한 다양한 오류들을 찾아내고 수정하는데 많은 도움이 되었습니다. 이 연구를 마치면서, 그 동안 국내외 학회지를 통해 접했던, 너무 익숙하여 친근감 조차 느껴지던 연구자들도 이와 같은 난관을 만났고 남모르는 노력과 인내를 통해 연구를 완료했을 것을 생각 하면 그 분들께 새삼 머리를 숙여 존경심을 표하고 싶습니다.

마지막으로, 만삭의 배를 하고 새벽 귀가를 기다려 주었고 생애 첫 출산의 고통과 육아의 고단함에도 무심한 남편을 이해해준 아내와, 연구에만 몰두 할 수 있게 탈없이 무럭무럭 자라주는 딸 민영이에게 고마운 마음을 전합니다.

저자 드림

차 례

그림 차례 ····· iii
표 차례 ····· iii
국문 요약 ····· iv
제1장 서론 ····· 1
제2장 재료 및 방법 ····· 4
2.1. 만성 신부전증 동물 모델 ····· 4
2.2. 실험 조작 ····· 4
2.3. 생화학적 인자 측정 ····· 5
2.4. mRNA 발현의 측정 ····· 5
2.4.1. 총 RNA 추출 ····· 5
2.4.2. Primer 제작과 확인 ····· 5
2.4.3. mRNA 발현량의 상대적 비교 ····· 6
2.5. 단백질 발현의 측정 ····· 7
2.5.1. 단백질 추출과 정량 ····· 7
2.5.2. 단백질 전기 영동 ····· 7
2.5.3. 단백질 발현량의 상대적 비교 ····· 7
2.6. 조직 검사 ····· 8
2.6.1. Hematoxylin-eosin 염색 ····· 8
2.6.2. 면역조직화학 염색 ····· 9
2.6.3. TUNEL 염색 ····· 10
2.7. 통계 처리 ····· 10
제3장 결과 ····· 11
3.1. 생화학적 인자 ····· 11
3.2. mRNA 와 단백질의 발현율 ····· 11
3.3. 조직 변화 ····· 12
3.3.1. Hematoxylin-eosin 염색 ····· 12
3.3.2. 면역조직화학 염색 ····· 12
3.3.3. TUNEL 염색 ····· 13
제4장 고찰 ····· 22
제5장 결론 ····· 26
참고 문헌 ····· 27
영문 요약 ····· 31

그림 차례

그림1. The biochemical parameters ····· 15
그림2. Histologic feature of kidneys ····· 16
그림3. The biomolecular expression of iNOS and immunohistochemical staining for iNOS ····· 17
그림4. The biomolecular expression of eNOS and immunohistochemical staining for eNOS ····· 18
그림5. The biomolecular expression of MCP-1 and immunohistochemical staining for MCP-1 ····· 19
그림6. The protein expression of nitrotyrosine and immunohistochemical staining for nitrotyrosine ····· 20
그림7. TUNEL staining of kidneys at 2^{nd} and 6^{th} day ····· 21

표 차례

표1. Animal groups of experimental design ····· 14
표2. The physical and biochemical parameters ····· 14

국 문 요 약

배경 : 방사선 조영제는 신세동맥 수축과 활성산소 발생으로 신세뇨관 손상을 초래한다. Phosphodiesterase 5 길항제는 혈관 이완 작용과 더불어 최근에는 조직의 허혈-재관류 손상을 막는 항산화 작용도 있음이 보고 되고 있다. 이에 본 연구는 방사선 조영제 의 독성에 취약한 만성 신부전증 동물모델을 이용하여, phosphodiesterase 5 길항제가 방사선 조영제의 신독성을 완화할 수 있는지, 또한 기존에 예방적 목적으로 사용되고 있는 NAC 와 상승 작용이 있는 지를 알아보고자 한다.

방법 : 8-9주령 백서에서 5/6 신적출술을 시행하고 6-8주 경과 후, 혈충 크레아티닌이 0.5mg/dL 이상 상승한 백서를 무작위로 선별하여 각각 12마리씩 식염수 투여군, PDE-5i(phosphodiesterase 5 inhibitor)투여군, NAC(N-acetylcy-steine)투여군, PDE-5i와 NAC를 병합 투여한 군으로 나눈다. 방사선 조영제를 투여 전 24시간부터 12시간 간격으로 PDE-5i을 15mg/kg, NAC를 60mg/kg 각각 투여하며, 3번째 투약은 방사선 조영제 투여 1시간 전에 투약한다. 방사선 조영제 투여 후에는 48시간 간격으로 채혈과 24시간 소변검사를 시행하며 48시간에 각군에서 6마리씩 희생하여 조직을 얻는다.

결과 : 각군에서 48시간 간격으로 3회 측정한 BUN(blood urea nitrogen), 크레아티닌에는 의미 있는 차이가 없었으며, 6일째 측정한 크레아티닌 청소율에서 식염수 투여군의 0.25±0.87 mg/mL/100g 비해 PDE-5i 투여군(0.43±0.13mg/mL/100g)과 NAC 투여군0.39±0.79mg/mL/100g)에서 유의한 호전을 보였다. 방사선 조영제 투여 2일째와 4일째 측정한 혈청 NGAL(neutrophil gelatinase associated lipocalin)은 식염수 투여군은 각각 82.79±11.25pg/mL, 83.6±7.6pg/mL 인데 비해 PDE-5i 투여군은 각각 68.3±5.5pg/mL, 64.1±10.1pg/mL 로, 병합 투여군은 각각 58.3±19.6pg/mL, 53.8±19.3pg/mL 로 의미 있게 감소되어 있었다. 혈청 cystatin C 의 경우, 2일째 식염수 투여군은 7.53±1.3ng/mL 인데 비해서 PDE-5i 투여군은 5.28±0.9ng/mL, 병합 투여군은 5.8±0.66ng/mL 로 감소되어 있었으며, 방사선 조영제 투여 4일째 식염수 투여군의 cystatin C 는 7.6±0.9ng/mL 인데 비해 PDE-5i 투여군은 6.15±1.6ng/mL 로 의미 있는 차이를 보였다. 방사선 조영제 투여 2일째에 적출한 신장에서 iNOS의 mRNA 표현이나 단백질 발현에는 각 실험군 간의 차이가 없었으며, eNOS의 mRNA 표현과 단백질 발현에서는 식염수 투여군과 NAC 단독 투여군에 비해 PDE-5i 투여군과

PDE-5i 와 NAC 병합 투여군에서 의미 있게 감소되어 있었고, MCP-1(monocyte chemoattract-ant protein 1) 또한 eNOS 발현과 유사한 양상을 보였고, nitrotyrosine 발현은 식염수 투여군에 비해 PDE-5i 투여군, PDE-5i 와 NAC 를 병합 투여한 군, NAC 단독 투여군 모두에서 감소되어 있었다. 6일째 적출한 각군의 신장에서는 iNOS 발현에는 차이가 없었고, eNOS 발현은 다른 군에 비해 NAC 투여군에서 의미 있게 증가되어 있었고, MCP-1 발현 또한 유사한 양상을 보였으며, nitrotyrosine 발현은 모든 군에서 의미 있는 차이가 없었다. TUNEL 염색을 통해 알아본 세포 고사 과정은 실험 2일째에 PDE-5i 투여군과 PDE-5i와 NAC 병합 투여군에서 의미 있게 줄어들었으나 실험 6일째 각 실험군 간에 차이는 소실되었다.

결론 : PDE-5i를 이용한 전처치 와 후처치는 방사선 조영제로 인한 급성 신세관 손상을 막아주며 추후 발생하는 조직 내 염증반응과 세포 고사 과정도 완화시켜준다. NAC 단독 투여는 nitrotyrosine 발현을 억제하는 항산화 작용은 있지만 급성 신세뇨관 손상, 염증반응, 세포 고사 과정을 억제하지는 못한다. 그리고 NAC 와 PDE-5i의 병합 시에 의미 있는 상승 작용은 없었다.

핵심 되는 말 : 방사선 조영제, Phosphodiesterase 5 길항제,
활성 산소, 세포고사, NGAL, Cystatin C

방사선 조영제 유발 신경병증에서 phoshodiesterase 5 길항제와 N-acetylcysteine 이 나타내는 신장 보호 효과와 그 상승 작용

<지도 최 승 옥 교수>

연세대학교 대학원 의학과

유 종 명

제1장 서 론

요오드 함유 방사선 조영제에 의한 급성 신부전증은 병원 내 신부전증의 세 번째 흔한 요인이며[1], 최근 증가 추세에 있는 영상의학적 진단 및 치료법의 발달로 방사선 조영제 유발 신병증의 예방과 치료는 그 중요도가 점점 커지고 있다. 특히 만성 신부전증 환자들의 경우 컴퓨터 단층촬영이나 혈관 조영술 등의 검사 후 응급 혈액투석치료가 필요하거나 사망에까지 이르는 합병증 발생율이 높아서[2-5], 적절한 검사와 치료의 진행에 소극적일 수 밖에 없다. 지금까지 알려진 예방법으로는 등장성 생리식염수 정주, N-acetylcysteine(NAC), theophylline, sodium bicarbonate 투여 등이 있으며[6-9], NAC의 경우 아직도 논란의 여지는 있지만 여러 임상연구를 통해서 고위험군 환자에 투여했을 때 잇점이 있다고 알려져 있다[10]. 방사선 조영제 신독성의 주요기전은 endothelin을 매개로 한 혈관수축, ATP과다 소모에 의한 신수질 내 허혈과 그로 인한 활성 산소에 의한 손상, 세뇨관 상피세포에 대한 직접적인 독작용 등으로 알려져 있다[11-13]. 여기서 NAC는 주로 세포 내 glutathione 생합성을 증가시켜

활성 산소로부터 세포 내 단백질과 DNA를 보호하고 세포 내 세포 고사 신호 전달계(apoptotic signal transduction pathway)를 차단해 주며, 또한 경-중등도의 혈관이완 작용을 통해서 신장 기능을 보호해 주는 것으로 알려져 있다[14-16].

최근 여러 동물 실험연구에서 신장과 심근에 대한 허혈-재관류 손상에 관한 연구들이나 당뇨병성 신병증에 대한 연구에서 제5형 phosphodiesterase 5 길항제(PDE-5i)가 nitric oxide 발현을 조절하여 신조직 내 허혈과 산화적 스트레스를 줄여주며[17-20], cyclic GMP - ERK1/2 pathway를 통한 항-세포 고사(anti-apoptotic effect)효과가 있다고 보고 되었다[21]. Endothelin, prostaglandin E_2, adenosine, nitric oxide 등의 긴밀한 균형에 의해 조절 받던 신세동맥은 방사선 조영제가 투여된 후에 주로 endothelin 생성이 증가되어 수축이 발생하고 신수질과 원위 세뇨관의 허혈이 조장되므로 endothelin의 길항제인 nitric oxide의 효과를 증강시킬 수 있는 PDE-5i는 신수질 내 허혈을 개선할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 항산화 효과를 통해 신수질 내 산화적 스트레스를 줄여 주고, 세포 고사 신호 전달계를 차단하여 허혈과 활성산소에 의해 손상된 세뇨관 세포의 고사를 완화시켜 신기능의 빠른 회복을 도와줄 것으로 기대된다. 또한 NAC와 PDE-5i는 작용기전 상에 상호보완적 측면이 있으므로 이들 약제를 동시 투여 하였을 때에 신장보호 효과의 상승작용이 있을 것으로 예측된다. 한편 임상연구에서 흔히 사용하는 방사선 조영제 유발 신병증의 기준은 방사선 조영제 투여 48시간 내에 혈중 크레아티닌이 0.5mg/dL 이상 상승하거나 기저치에서 25% 이상 상승했을 경우로 정하고 있으나[22], 혈중 크레아티닌 수치 자체가 신장 손상의 정도나 기능평가에 한계점이 많아 좀 더 예민하고 특이성이 높은 cystatin C나 neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)과 같은 조기 표지자를 통한 평가가 적합하다는 연구들이 있다[35].

본 연구에서는 방사선 조영제 유발 신병증의 고위험군이라고 할 수 있는 만성 신부전증의 동물모델로써 5/6 신장절제 백서를 이용하였으며, PDE-5i 투여가 만성 신병증 상태의 신장에서 요오드 함유 조영제에 의한 초기 신장 손상을 보호하는지를 다음의 항목들을 통해 살펴보았다. 측정 항목들은 1)전통적인 신기능 표지자인 blood urea nitrogen (BUN), 크레아티닌, 크레아티닌 청소율의 변화, 2)최근 주목 받고 있는 신손상의 조기 표지자인 cystatin C와 NGAL과 전통적인 신기능 표지자와 비교, 3)inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 endothelial nitric oxide synthase

(eNOS) 발현 정도를 통한 조직 내 산화적 스트레스의 정도 평가, 4)산화적 손상으로 생성되는 세포질 내의 변성 단백질인 nitrotyrosine 측정을 통한 산화적 손상의 양적 비교, 5)monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)의 발현 측정을 통한 조직의 염증반응 관찰, 및 6)terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 염색을 통해 손상된 세포의 고사 과정을 비교 등 이다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 만성 신부전증 동물 모델

9주령 수컷 백서 (Sprague-Dawley rat, 250-300g)에서 측부 절개법을 이용하여 좌측 신장은 완전히 제거하고 우측 신장은 신장 경부 (pedicle)와 중엽이 손상되지 않도록 주의하면서 상엽과 하엽을 절제해 내고, 절제면은 지혈을 위해 써지셀 (Surgicel®, 존슨 앤 존슨)로 덮고 5분간 압박하였다. 수술 후 일반 식이를 주면서 6-8주 경과 후 혈중 크레아티닌 수치를 확인하여 0.5-1.5mg/dL 범위에 속하는 백서만을 실험에 사용하였다.

2.2. 실험 조작

무작위 선별을 통해 48마리의 백서를 각군에 12마리씩 4군으로 나눠, 실험 시작 1일전에 대사상자 (metabolic cage)로 옮겨 24시간 소변채집과 혈압측정을 시행하였다. 모든 실험군에 방사선 조영제 투여 24시간 전에 각각 식염수 5ml, phosphodiesterase 5 길항제 (Viagra®, Pfizer pharm., Korea) 1.5mg/kg, N-acetylcysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 60mg/kg 와 Pphospodiesterase 5 길항제 병합, N-acetylcysteine 60mg/kg 을 정해진 시간 순서대로 경구 투여하였다(표1). 제 3번째 투약 1시간 경과 후 모든 실험군에 외경정맥 혹은 꼬리 측부정맥를 통해 방사선 조영제 (Ultravist®, 한국 쉐링)를 8mL/kg 용량으로 투여하였다. 방사선 조영제 투여 후 대사상자에서 일반 식이를 공급하였다. 첫 48시간 경과 후, 각군에서 6마리씩 희생시켜 잔여 신장을 적출하고 -80℃ 급속 냉동 및 5% 포르말린 용액에 나눠 보관하였다. 각군의 나머지는 6일간 매 48시간 간격으로 24시간 소변채집과 채혈을 시행하며, 6일째 모든 실험군을 희생시켜 같은 방법으로 잔여 신장조직을 보관하였다.

2.3. 생화학적 인자 측정

혈중 BUN과 크레아티닌, 소변내 크레아티닌은 Jaffe 반응을 응용한 kinetic colometric assay (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, cystatin C 과 NGAL은 ELISA kit (Biovendor, Czech Republic)를 사용하여 측정하였다.

2.4. mRNA 발현의 측정

2.4.1. 총 RNA 추출

냉동 보관되어 있는 각 실험군의 신장조직을 30-50mg 정도 잘라내어 TRIzol solution (Invetrogen Life Science, USA) 1ml에 넣고 분쇄기로 충분히 분쇄한 후 chlorform 200ul을 혼합하여 4℃ 에서 12,000rpm으로 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액 만을 분리하여 Isopropanol과 1:1의 부피 비율로 혼합하고 다시 4℃에서 12,000rpm으로 15분간 원심분리하며, 튜브의 바닥에 침전물만 취하여 75% alcohol로 정제한 후 Spectrophotometer (Bio-rad, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. 추출한 총 RNA는 Quantitect Reverse transcription kit (Qiagen, Germany)으로 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다.

2.4.2. Primer 제작과 확인

Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통해 백서에서 확인된 β-actin, iNOS, eNOS, MCP-1의 총기염기서열로 Primer 3 (soureforge.net) 프로그램을 이용하여 (Melting temperature 55℃, 20 base-pairs, GC contents 55%) 다음과 같은 primer를 제작하였다.

• Beta-actin : Sense 5′-TGT GTT CTT GCC CTC TTT GC -3′

Antisense 3′- CTA CGT ACA TGG CTG GGG TG -5′

• iNOS : Sense 5′-TCA GCT ACG CCT TCA ACA CC -3′

Antisense 3′- GTC TCC ATT GCC AAA TGT GC -5′

• eNOS : Sense GAG GCC TTG GTA TTG GTG GT -3′

Antisense 3′- CCA GCC CAA ACA CAC AGA AC -5′

• MCP-1 : Sense 5′-TGG GCC TGT TGT TCA CAG TT -3′

Antisense 3′- TCC TTA TTG GGG TCA GCA CA -5′

상기 primer의 sense 10pmol, antisense 10pmol과 각 실험군의 cDNA 2uL를 Maxime PCR PreMix kit (iNtRon Biotechnology, Korea)에 혼합하여 55-60℃ 의 annealing 온도 구간에서 Gradient PCR 시행하고, 생성물은 ethidium bromide가 혼합된 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하였으며 365nm 파장의 자외선으로 DNA 띠를 확인한 결과 제작된 primer 의 최적 annealing 온도는 59.5℃ 였다.

2.4.3. mRNA 발현량의 상대적 비교

제작된 primer를 이용하여 Quantitect Sybr-green PCR Master Mix (Qiagen, Germany)에 각군의 cDNA를 400ng씩 분주하고 RotorGene Real-Time Q-PCR system (Corbett, Australia)에서 Annealing 온도를 59.5℃ 로 설정하고 PCR를 시행하였다. Real time RT-PCR 결과는 $2^{-[delta][delta]Ct}$ 방법으로 참조유전자로 상대 정량 하였다.

2.5. 단백질 발현의 측정

2.5.1. 단백질 추출과 정량

냉동 보관된 조직에서 75mg 정도의 조직을 잘라내어 RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) buffer 용액 500ul에 넣고 분쇄기로 분쇄하고 4℃에서 14,000rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 상층액 중 일부 (5-10uL)를 Bradford assay buffer (Bio-rad, CA, USA)에 혼합하여 Biotek microplate reader (US Biotek, WA, USA)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하고 Bovine serum albumin (USB corporation, OH, USA)으로 만든 표준그래프를 통해서 각 시료의 단백질을 정량 하였다.

2.5.2. 단백질 전기영동

각 실험군의 단백질 추출물에서 총 단백질량이 30ug 되도록 분리 분주한 후 Sampling buffer (Bio-rad, CA, USA)와 1:1의 부피 비율로 혼합하고 95℃에서 5분간 끓인 후 7.5% 혹은 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에서 전기영동 (100V, 60-90min)을 시행하였다.

2.5.3. 단백질 발현량의 상대적 비교

전기영동이 끝난 겔은 polyvinylidene difluoride (PVDF)막으로 이동(100V, 60분)시킨 후 TBST (10mM Tris-HCl, NaCl 0.05%, Tween 20%, 1mM EDTA, ph 7.4) 용액에 5%가 되도록 Skim milk (Merck, Germany)를 첨가하여 1시간 동안 blocking을 시행하였다. Blocking된 겔은 실온에서 2시간 동안 다음과 같은 일차항체 용액에 담가 두었다.

• β-actin (Santa Cruz, 1:500 dilution in 5% skim milk)

• iNOS (Novus, 1:1000 dilution in 5% skim milk)

• eNOS (Santa Cruz, 1:500 dilution in 5% skim milk)

• MCP-1 (Novus, 1:1000 dilution in 5% skim milk)

• Nitrotyrosine (Milipore, 1:2000 dilution in 5% skim milk)

일차항체를 붙인 후 TBST로 15씩 3회 세척을 시행하고 실온에서 goat anti-rabbit IgG HRP (1:1000 dilution, Santa Cruz, CA, USA) 용액에 1시간 동안 담가 이차항체를 붙였다. 이차항체가 붙은 막에 산화제 (peroxidase)에 의한 화학발광을 유발하기 위해 ECL (Amersham Life science, IL, USA) 용액에 1분간 담가두었다가 FluorChem FC2(Alpha innotech, CA, USA)에서 화학발광으로 만들어진 단백질 띠를 확인하였으며, 정량화를 위해 FluorChem FC2 software에서 band-analysis를 시행하였다.

2.6. 조직 검사

2.6.1. Hematoxylin-eosin 염색

각 실험군의 5% 포르말린에 고정했던 조직을 paraffin-block으로 제작하여 5um 두께의 박편으로 잘라 유리판 위에 붙여서 50℃ 건조기에서 2시간 동안 paraffin을 제거하였다. 다음으로 유리판 위의 조직을 Alcohol로 세척한 후 6분간 Hematoxylin에 담가두었다가 식염수로 세척했으며, 70% alcohol과 1% HCl로 재수화과정 (rehydrate)을 거친 후 3분간 eosin에 노출시키고 다시 재수화를 시행했다. 마지막으로 xylene 용액에 3분간 담가두었다가 덮개유리로 덮어 현미경으로 관찰하였다.

2.6.2. 면역조직화학 염색

Paraffin block으로 제작된 조직을 5um 두께의 박편으로 잘라 유리판에 고정하여 paraffin 제거 과정을 거친 후 99℃ 에서 15분간 열을 가하여 항원성을 회복시켰다. 조직내 산화제 (endogenous peroxidase)를 비활성화 시키기 위해서 hydrogen peroxide block (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)으로 10분간 처리하고 비특이적 항원성을 억제하기 위해 ultra V block (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)으로 5분간 처리하였다. 일차항체를 아래와 같은 조성으로 2시간 동안 붙였다.

• β-actin (1:200, Thermo scientific, CA, USA)

• iNOS (1:100, Novus)

• eNOS (1:200, Thermo scientific, CA, USA)

• MCP-1 (1:100, Novus)

• Nitrotyrosine (1:200, Milipore)

충분히 세척한 조직에 HRP polymer 이차항체 (Thermo Fisher scientitif, CA, USA)로 30분간 처리하고 3-amino-9-ethylcarazole (LabVision, CA, USA)로 10분간 염색하였고, 마지막으로 Mayer's hematoxyin 으로 배경염색을 시행했다. 염색된 조직은 analySIS 3.1 (Soft Imaging System, Germany) 프로그램으로 총면적당 염색된 부분의 백분율로 정량 하였다.

2.6.3. TUNEL 염색

DeadEnd Colorimetric System kit (Promega, WI, USA)의 권장 지침에 따라서, 파라핀 블록에서 5um 두께의 조직박편을 잘라내어 파라핀을 제거한 후 proteinase K (20ug/ml) 용액에 15분간 담가두었다. Phosphate buffered saline (PBS)으로 세척 후 4% paraformaldehyde 용액으로 5분간 다시

고정하였다. 고정된 각각의 조직박편을 equilibration buffer 100uL 에 5분 동안 담가두었다가 rTdT 혼합용액 (Equilibration buffer 98uL, Biotinylated Neucleotide mix 1uL and rTdT Enzyme 1uL)에 옮겨 1시간 동안 반응시켰다. 다음으로 PBS에서 5분간 세척 후 streptavidin-HRP 용액 (1:500 in PBS) 100uL 씩 각 조직박편에 분주하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 마지막으로 세가지 DAB 구성용액 (substrate buffer 50uL, chromogen 50uL and hydrogen peroxide 50uL in deionized water)을 혼합하여 10분간 발색반응을 시킨 후 슬라이드를 영구보존처리 하였다.

2.7. 통계 처리

SPSS 12.0 버전을 사용하여 측정치는 평균값과 표준편차로 표현하였으며, 실험군 간의 평균값 비교를 위해서 Kruskal-Wallis 검사와 Mann-Whitney U 검사를 시행하였고 p 값이 0.05미만 인 경우에 통계학적 의미가 있는 것으로 판정하였다.

제3장 결 과

3.1. 생화학적 표지자

무작위 선별된 각 실험군에서 실험 시작 시 체중, 수축기 혈압, 혈중 BUN과 크레아티닌, 크레아티닌 청소율에는 유의한 차이가 없었다 (**표2**). 방사선 조영제 투여후 혈중 BUN과 크레아티닌은 2일째와 4일째 상승하는 경향은 있으나 모든 실험기간 내에 각 실험군 간의 의미 있는 차이는 없었다 (**그림1A 및 B**). 크레아틴 청소율은 2일째 증가는 경향을 보이나 각 실험군 간의 의미 있는 차이는 없었으며 6일째 측정치에서 PDE-5i 투여군 (P = 0.025)과 NAC와 PDE-5i를 병용 투여한 군 (P = 0.028)에서 식염수 투여군에 비해 방사선 조영제 투여로 감소되었던 크레아틴 청소율이 의미 있게 회복되는 소견을 보였다(그림**1C**). 혈중 NGAL 은 모든 실험군에서 2일부터 4일까지 기저치의 2-3배 상승되었다가 6일째에는 기저치로 회복되었으며, 특히 2일과 4일에는 식염수 투여군이 PDE-5i 투여군 (P = 0.018, P = 0.006)과 NAC 및 PDE-5i 병합 투여군 (P = 0.018, P = 0.028)에 비해 의미 있게 큰 상승치를 보였다 (**그림1D**). 혈중 cystatin C 은 NAC 투여군을 제외하고 방사선 조영제 투여 후 서서히 상승되는 경향을 보이며, 특히 2일째 식염수 투여군에 비해 PDE-5i 투여군 (P = 0.011)과 PDE-5i 와 NAC 병합 투여군 (P = 0.028)에서 유의하게 적은 상승치를 보였다 (**그림1E**).

3.2. mRNA 및 단백질 발현

모든 실험군에서 방사선 조영제 투여 2일째 (48시간)와 6일째 (144시간) 적출한 조직으로 iNOS, eNOS, MCP-1, nitrotyrosine 발현량을 측정하였다. iNOS 의 mRNA 발현은 모든 실험군에서 2일째 상승되었다가 6일째 감소하는 경향을 보이나 각 군간의 의미 있는 차이는 없었다 (**그림3A**). iNOS 단백질 발현도 동일한 소견을 보였다 (**그림3B 및 C**). eNOS의 mRNA 발현은 2일째 PDE-

5i 투여군 (P = 0.004)과 NAC와 PDE-5i 병합투여군 (P = 0.004)에 비해 식염 투여군과 NAC 단독 투여군에서 의미 있게 상승되어 있었으며, 6일째는 다른 군 (P < 0.017)에 비해 NAC 단독 투여군에서 eNOS 발현이 증가되어 있었다 (**그림4A**). eNOS 단백질 발현은 2일째는 mRNA 발현과 동일한 소견을 보이지만 6일째에서는 각 실험군의 차이는 뚜렷하지 않았다(**그림4B 및 C**). 실험 2일째에 MCP-1 mRNA발현은 식염수 투여군 (P = 0.004)과 NAC 단독 투여군 (P = 0.004)에서 의미 있게 증가되어 있었고, 6일째는 NAC 단독 투여군은 다른 실험군 (P < 0.001)에 비해 의미 있게 증가되어 있었다 (**그림5A**). 단백질 발현에서도 실험 2일째 식염수군과 NAC 군에서 MCP-1 이 증가되며 6일째는 다른 실험군에 비해 NAC 군에서 높게 유지 되었다 (**그림5B 및 C**). nitrotyrosine 단백 발현에서는 실험 2일째 식염수 투여군과 NAC 단독 투여군에서 유의하게 증가된 소견을 보이나 실험 6일째는 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (**그림6A 및 B**).

3.3. 조직 변화

3.3.1. Hematoxylin-eosin 염색

근위 및 원위 세뇨관을 동시에 관찰할 수 있는 외측 수질을 중심으로 관찰한 결과, 모든 실험군에서 세뇨관 세포의 공포화, 융모 소실, 유리질성 원주에 의한 내강 폐쇄 소견이 보였다. 그러나 식염수 군과 NAC 군에서는 75% 이상의 광범위한 손상이 나타난 반면 PDE-5i 군과 PDE-5i 와 NAC 동시 투여군에서는 50% 이하의 미만성 손상을 보였다 (**그림2A 및 B**). 내측 수질에서의 관찰에서는 모든 실험군에서 특이 변화의 소견은 없었다.

3.3.2. 면역조직화학 염색

iNOS 염색에서 실험 2일째 조직은 주로 사구체와 간질내 혈관내피세포에

iNOS 발현이 증가된 소견이 보이나 (**그림3C**), analySIS을 이용한 분석에서는 각 군간의 차이는 없었으며, 실험 6일째 조직에서는 iNOS 염색을 거의 확인할 수 없었다. eNOS 염색 상에서 공포화와 확장 등의 세뇨관 손상이 심한 부위에서 발현이 증가된 소견을 보이고 있으며 (**그림4D 및 E**), analySIS 분석에서, 2일째 식염수군 과 NAC 단독 투여군에서 의미 있게 증가되어 있었고, 6일째에는 식염수군에서 PDE-5i 군과 PDE-5i 와 NAC 병합한 군에 비해 유의하게 높은 발현을 보이고 있었다 (**그림4F**). MCP-1 염색 상에서는 2일째 PDE-5i군이 식염수군에 비해서 유의하게 낮게 발현되었으며 (**그림5D 및 F**), 6일째는 NAC 단독 투여군에서 식염수 투여군을 포함한 다른 군에 비해 MCP-1의 발현이 증가되어 있었다 (**그림5E 및 F**). Nitrotyrosine 염색에서 실험 2일째 PDE-5i군과 PDE-5i 와 NAC 병합한 군에 비해 식염수군과 NAC 단독 투여군에서 높게 발현되고 있었으나 (**그림6C 및 D**), 6일째 모든 실험군의 조직에서는 nitrotyrosine 염색이 뚜렷하게 차이가 없었다.

3.3.3. TUNEL 염색

실험 2일째 식염수 투여군과 NAC 투여군에서 다른 실험군에 비해 TUNEL 염색도가 증가되어 있었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (**그림7A 및 C**). 6일째에는 식염수 투여군과 PDE-5i 와 NAC 병합 투여군에서 다소 TUNEL 양성율이 높아 보이지만 이미지 분석 상에서는 모든 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (**그림7B 및 C**).

표1. Animal groups of experimental design

Group	N	Modulation
Vehicle	12	Distilled water 5mL , 4 times for 2 days
PDE-5i	12	Sildenafil 1.5mg/kg in Distilled water, 4 times for 2 days
PDE-5i + NAC	12	Sildenafil 1.5mg/kg with NAC 60mg/kg in distilled water, 4 times for 2 days
NAC	12	NAC 60mg/kg in distilled water, 4 times for 2 days

Vehicle : Normal saline, NAC : N-acetylcysteine, PDE-5i : phosphodiesterase type 5 inhibitor (Sildenafil, Viagra®)

표2. The physical and biochemical parameters

Group	Body weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)	Blood urea nitrogen (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Creatinine clearance (mg/mL/100g)
Vehicle	519.7 ± 81	137.4 ± 16	30.7 ± 9	0.8 ± 0.44	0.26 ± 0.09
PDE-5i	505.4 ± 28	133.7 ± 19	27.3 ± 11	0.66 ± 0.56	0.49 ± 0.19
PDE5i + NAC	532.2 ± 51	125.6 ± 14	31.5 ± 10	0.59 ± 0.17	0.24 ± 0.75
NAC	472.2 ± 69	132.3 ± 11	41.5 ± 37	0.87 ± 0.72	0.19 ± 0.12

Vehicle : Normal saline, NAC : N-acetylcysteine, PDE-5i : phosphodiesterase type 5 inhibitor (Sildenafil, Viagra®)

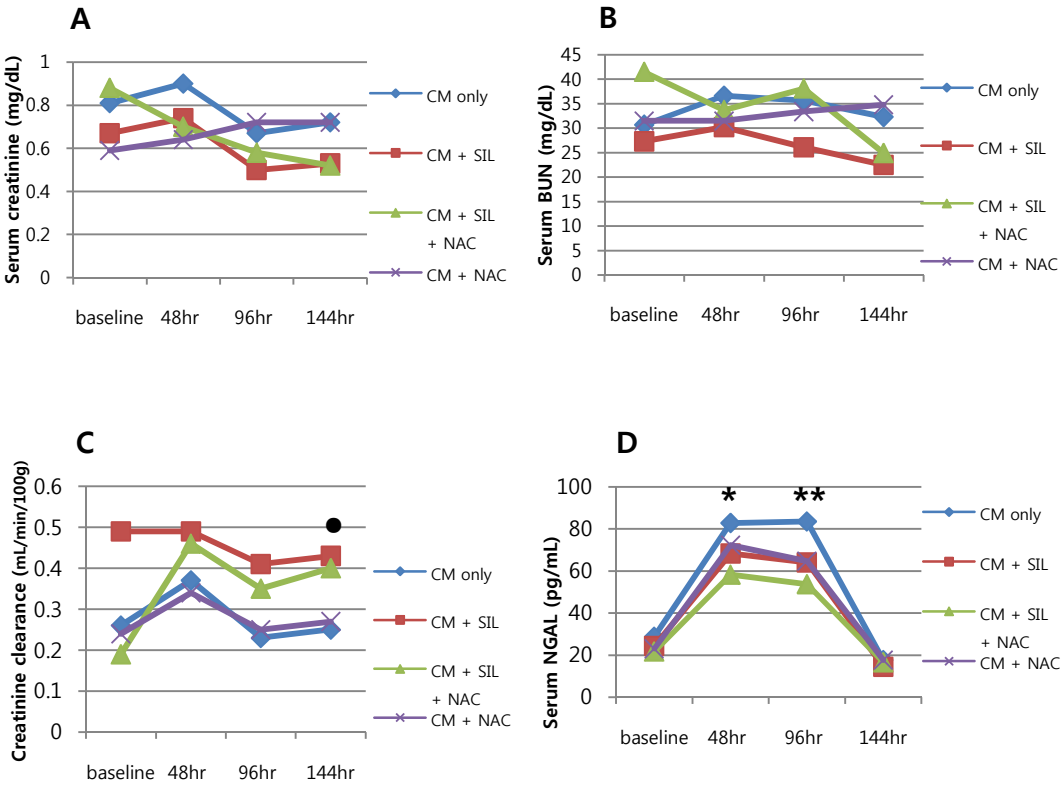
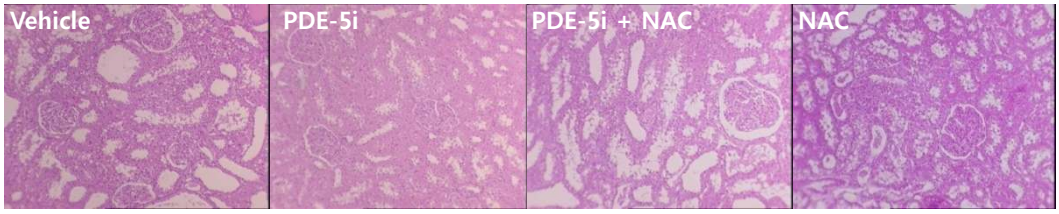


그림 1. The biochemical parameters

A 는 혈중 크레아티닌의 변화량으로, SIL + NAC 군을 제외한 나머지 군에서 실험 48시간과 96시간 사이에 상승하였고 이후로는 변화가 없었으며 모든 실험군에서 의미 있는 차이는 보이지 않았다. **B** 는 혈중 BUN 변화량으로, 시간 경과에 따른 각 실험군 간의 차이는 없었다. **C** 는 크레아티닌 청소율의 변화로 실험 144시간 경과 시에 SIL 및 SIL + NAC 군에서 의미 있게 보존 되었다 (● : $P < 0.05$).

D 는 시간경과에 따른 NGAL 의 변화로, 실험 48시간에 식염수(CM only)군이 SIL 및 SIL + NAC 군에 비해 의미 있게 높았으며 (* : $P < 0.05$), 실험 96시간에는 식염수군이 모든 군에 비해 증가되어 있었고 (** : $P < 0.05$), 실험 종료 시에는 모든 군에서 CM 투여 전 상태로 감소되었다. **E** 는 cystatin C 의 변화로, 모든 실험 군에서 CM 투여와 함께 상승하기 시작하였으며, 실험 96시간에는 감소하였다. 실험 48시간에는 다른 군에 비해 식염수군과 NAC 군에서 의미 있게 증가되어 있었다 (€ : $P < 0.05$).

A



B

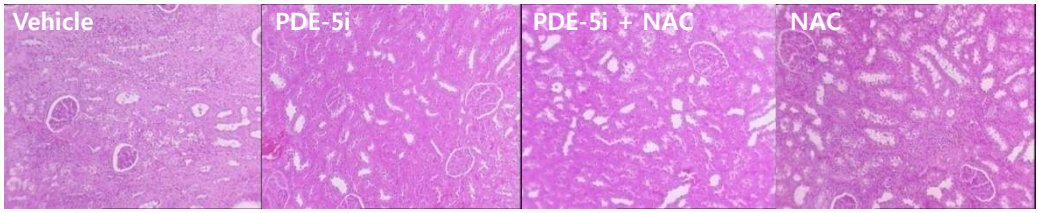


그림 2. Histologic feature of kidneys

근위 및 원위 세뇨관을 동시에 관찰할 수 있는 외측 수질을 중심으로 관찰한 결과, 실험 2일째 **A** 조직소견에서는, 모든 실험군에서 세뇨관 세포의 공포화, 융모 소실, 유리질성 원주에 의한 내강 폐쇄 소견이 보였으나 식염수(Vehicle)군과 NAC 군에서는 75% 이상의 광범위한 손상이 나타난 반면 PDE-5i 군과 PDE-5i 와 NAC 동시 투여군에서는 50% 이하의 미만성 손상을 보였다. 실험 6일째 조직소견 **B** 에서, PDE-5i 군과 PDE-5i + NAC 군은 정상 구조를 회복하였으나 식염수군과 NAC 군에서는 세뇨관의 위축과 광범위한 간질 섬유화 소견을 보인다.

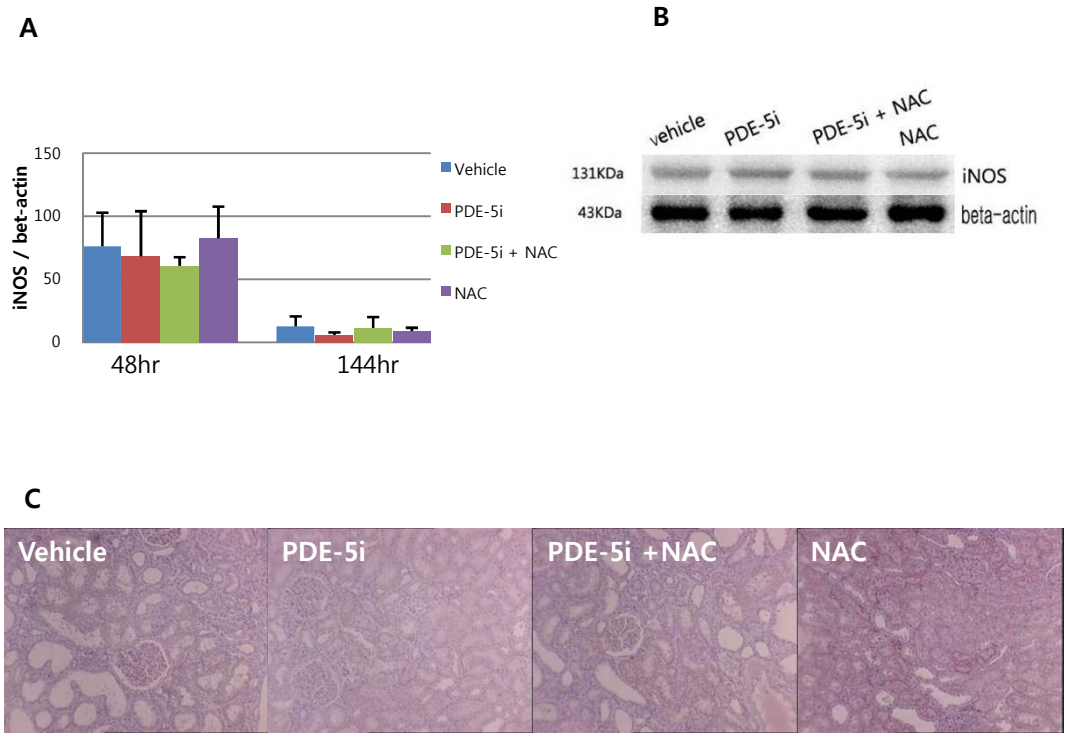


그림 3. The biomolecular expression of iNOS and immunohistochemical staining for iNOS

A 는 실험 2일째와 6일째 iNOS 의 mRNA 발현율 나타낸 것으로, 2일째 모든 실험군에서 증가되었다가 6일째 모두 기저치로 떨어지는 양상을 보였으며, 실험 2일째에 단백질 전기영동 결과 **B** 와 면역조직화학 염색법 **C** 를 이용해 측정한 iNOS 발현은 주로 세뇨관 상피세포에서 나타났으며 발현율에서 각 군간에 차이가 없었다.

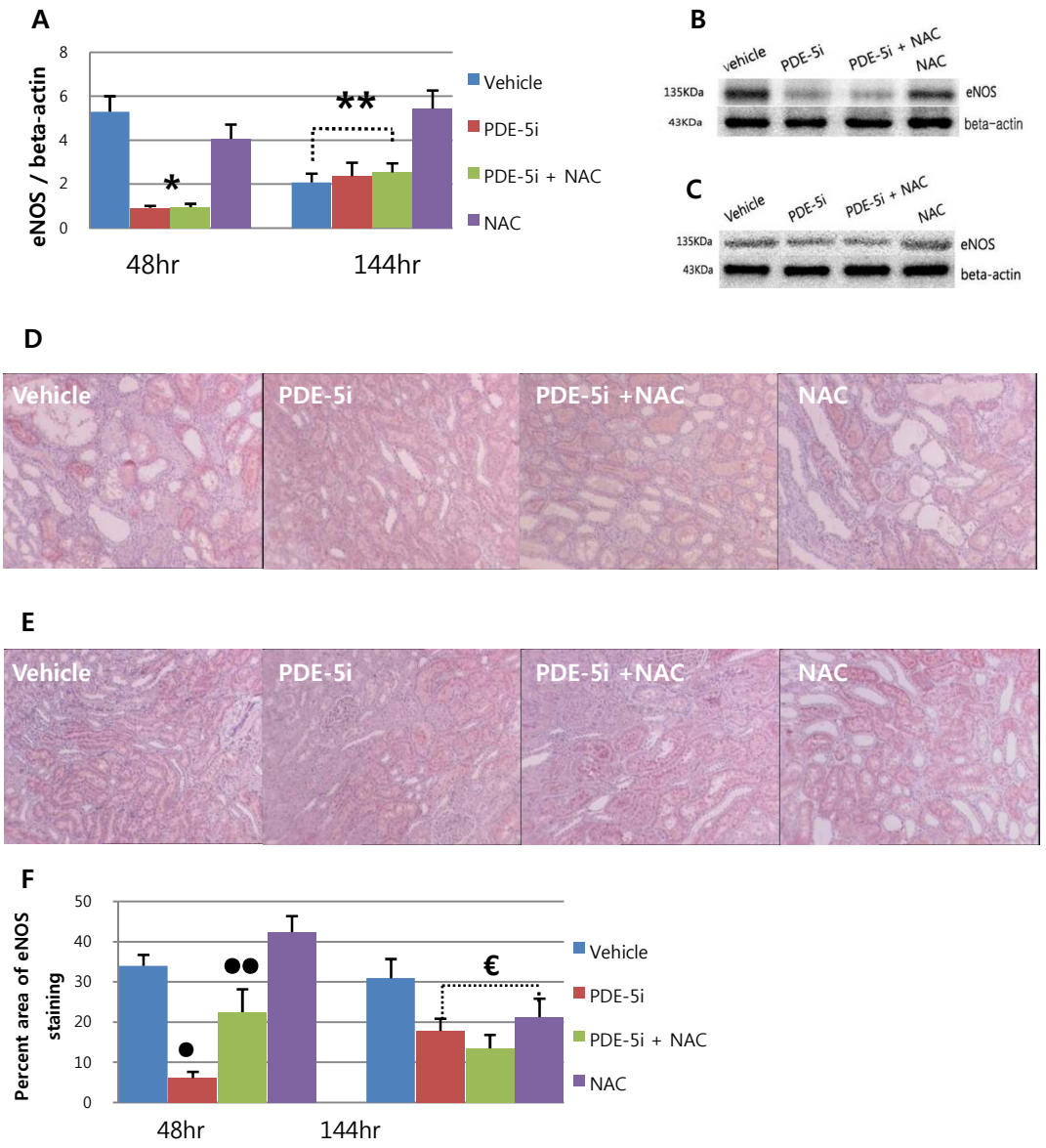


그림 4. The biomolecular expression of eNOS and immunohistochemical staining for eNOS

A 에서 실험 2일째 SIL 군과 SIL + NAC 군에서 의미 있게 eNOS mRNA 발현이 감소 되었으며(***** : $p < 0.001$), 6일째는 다른 군에 비해서 NAC 군에서 eNOS mRNA 발현율이 증가되어 있었다(****** : $p < 0.05$)). **B**, **D** 및 **F** 에서는 실험 2일째 mRNA 발현과 유사한 양상의 eNOS 단백질 발현을 보여준다. 특히 식염수(vehicle)군과 NAC 군의 조직에서는 파괴가 심각한 세뇨관에서 보다는 중등도 손상을 보이는 세뇨관 상피세포에서 eNOS 가 발현되고 있다. **C** 와 **E** 는 실험 6일째에 각 실험군 간의 eNOS 단백질 발현율의 차이가 많이 줄어든 것을 보여주고 있으나, **F** 의 이미지 분석기를 이용한 분석에서는 다른 군에 비해 식염수군에서 eNOS 발현율이 증가되어 있다(**€** : $p < 0.05$).

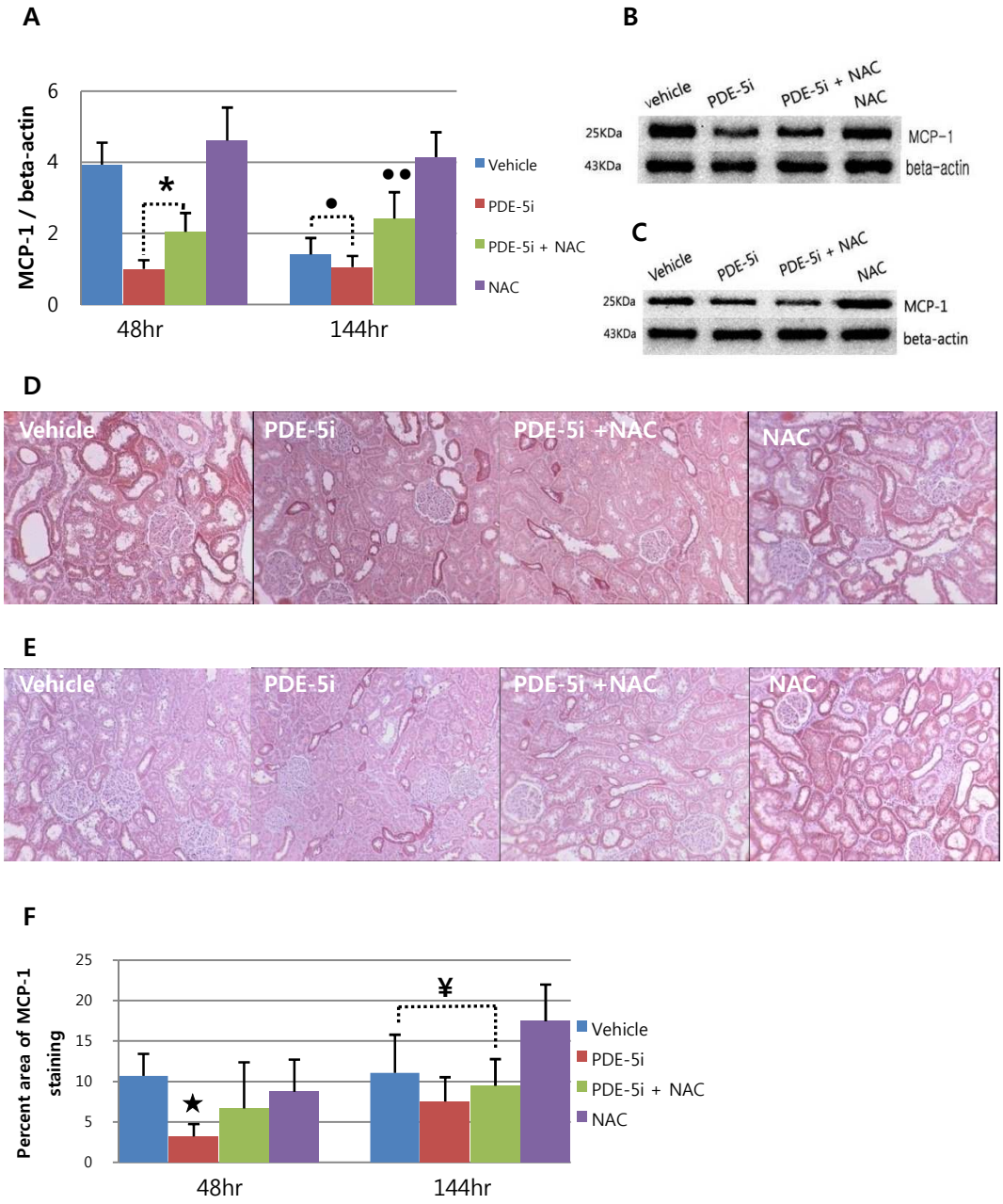


그림 5. The biomolecular expression of MCP-1 and immunohistochemical staining for MCP-1

A 에서 MCP-1 의 mRNA 발현율은 실험 2일째 식염수(vehicle)군과 NAC 군에서 의미 있게 증가되었으며 (*:$P < 0.001$), 6일째는 다른 군에 비해 NAC 군에서 의미 있는 증가를 보였다 (●: $P < 0.001$, ●●: $P < 0.05$). **B** 와 **D** 그리고 **F** 에서 MCP-1 단백질 발현율도 mRNA 발현과 유사한 양상을 보였으며, **C** 와 **E** 그리고 **F** 에서 6일째는 다른 실험군에 비해 NAC 군에서 MCP-1 단백질 발현이 의미 있게 증가되어 있었다 (¥: $P < 0.05$))

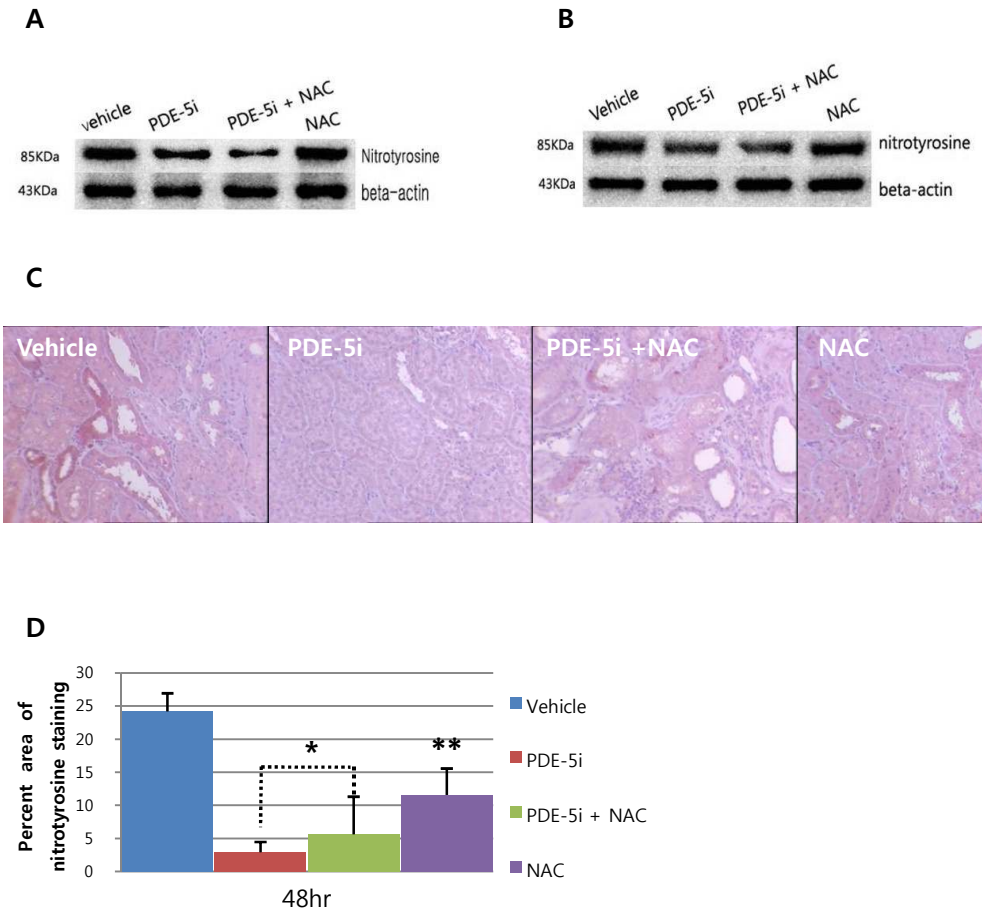
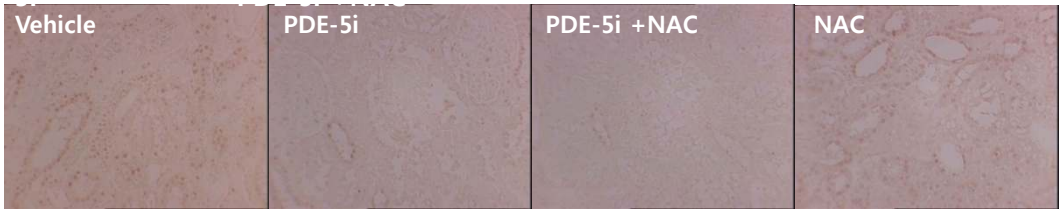


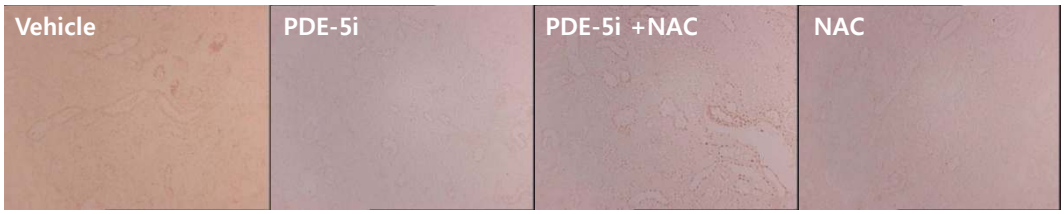
그림 6. The protein expression of nitrotyrosine and immunohistochemical staining for nitrotyrosine

A 와 **C** 그리고 **D** 는 실험 2일째 nitrotyrosine 단백질 발현을 보여주는 것으로, PDE-5i 군과 PDE-5i + NAC 군에서 의미 있게 감소되어 있었다 (***** : $P < 0.001$). 또한 NAC 군에서 식염수(vehicle)군에 비해 통계학적으로 의미 있게 감소되어 있었다 (****** : $P < 0.05$). nitrotyrosine 발현은 eNOS 와는 다르게 주로 파괴가 심한 세뇨관에서 발현되고 있었다. 실험 6일째는 **B** 에서 같이 모든 실험군에서 nitrotyrosine 발현 양상의 차이는 없었다.

A



B



C

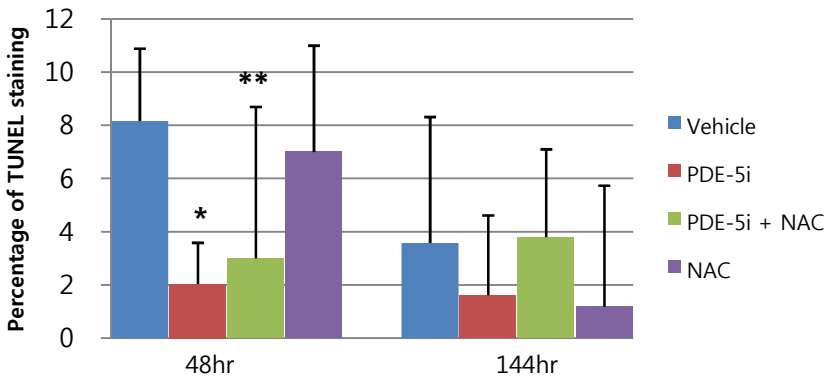


그림 7. TUNEL staining of kidneys at 2nd day and 6th day

A 는 파괴 정도가 심한 세뇨관 상피세포에서 TUNEL 양성율이 높게 나타남을 보여주며, 이미지 분석기를 이용해 비교했을 때 **C** 에서 보여지듯이 실험 2일째 PDE-5i 군과 PDE-5i+NAC 군에서 TUNEL 양성율이 의미 있게 줄어들었다 (***** : $P < 0.001$, ****** : $p < 0.05$). 그러나 실험 6일째에 **B** 의 염색소견에서 알 수 있듯이, 육안적으로는 식염수(vehicle) 군과 PDE-5i + NAC 군에서 TUNEL 양성율이 높아 보이나 이미지 분석 상에서 의미 있는 차이는 없었다.

제4장 고 찰

만성 신부전증은 신세뇨관 주위 모세혈관의 감소, 간질의 섬유화, renin-angiotensin system 의 활성에 따른 혈관 수축과 증식된 세뇨관에 의한 과다한 산소 소모 등의 이유로 만성적인 허혈 상태에 있게 된다[23]. 허혈 상태의 대사과정에서는 다량의 활성 산소가 발생하고 이는 신부전증의 진행에 주요한 악화인자이다[24]. 요오드를 함유한 방사선 조영제는 수입 세동맥의 수축을 유발하여 신세뇨관 전장에 걸친 허혈을 유발할 뿐만 아니라, 사구체에서 여과된 후 신세뇨관 내에서 활성 산소를 유발하여 상피세포에 직접적인 독작용을 일으킨다[25]. 세뇨관 상피세포는 조직의 허혈 상태에서는 활성 산소를 효과적으로 제거하지 못하며, 혈중 조영제의 농도가 감소하여 수입 세동맥의 수축이 해소되어도 재관류에 의한 2차적인 활성 산소 발생과정 때문에 세포 내에는 과도한 활성 산소가 축적되게 된다[26]. 이런 이유로 방사선 조영제 사용 후 발생하는 신병증 발생률이 정상에서 4-11% 인데 비해 만성 신부전증 환자에서는 50% 에 이른다[27].

본 실험에서는 생리적 환경에서 강력한 항산화제로 작용하는 NAC(N-acetylcysteine)는 방사선 조영제에 의한 NOS(nitric oxide synthase) 증가를 억제하지 못하는 것으로 나타났다. 허혈 상태 혹은 활성 산소가 증가하는 상황에서 이를 개선하기 위해 활성화 되는 NOS는 역작용으로 세포 내에 다량의 nitric oxide (NO)를 축적시키고 여러 기능성 단백질과 효소의 변성을 일으킨다고 알려져 있다[28-29]. 특히 단백질의 tyrosine 기와 반응하여 생성된 nitrotyrosine 은 안정된 구조를 갖게 되어 조직처리 과정에서도 변성되지 않고 소변에서도 쉽게 측정이 가능하다[29]. NAC을 단독으로 투여한 실험군에서 nitrotyrosine 발현이 증가된 것은 eNOS 증가와 연관된 결과로 볼 수 있으며, MCP-1 발현의 증가, 조직 내에 다수의 염증세포 침윤 등 일련의 과정 또한 eNOS 증가에 의한 것으로 설명할 수 있다. 결국 NAC의 항산화 작용으로는 신세뇨관 상피세포를 효과적으로 보호할 수 없었다고 판단된다.

그러나 실험 6일째 다른 실험군에 비해 NAC 군에서 MCP-1 발현이 유의하게 증가된 것은 주목할 만하다. MCP-1은 손상된 세뇨관 상피세포에서 자분비 (autocrane) 혹은 부분비 (paracrane) 형태로 분비되어 단핵구와 같은 염증세포의 조직내 침윤을 조장하고 IL-6와 같은 염증성 cytokine 분비를 촉진한다고 알려져 있다[30]. 따라서

식염수 투여군에 비해 NAC 군에서 손상의 정도가 치명적이지 않았고 괴사와 탈락의 정도가 적었기 때문에 나타난 현상으로 판단된다. 이것은 실험 2일째 nitrotyrosine 발현에서도 관찰할 수 있는데, 면역조직화학 염색에서 식염수 투여군에 비해 NAC 군에서 유의하게 발현율이 감소 되어 있다. 비록 통계학적으로 유의한 차이는 아니지만, 세포 고사 정도를 확인하기 위한 TUNEL 염색에서도 식염수 투여군에 비해서 세포고사 정도가 감소된 것을 관찰할 수 있다. 따라서 본 실험에서도 기존 Gong 등이 보고한 NAC 의 항산화 작용 및 항-세포고사 작용을 미약하게나마 확인할 수 있었다[31].

한편 본 실험에서 PDE-5i 투여군은 eNOS 및 nitrotyrosine 의 발현과 급성 세뇨관 괴사 범위가 감소되었다. 급성 세뇨관 괴사가 감소된 것은 Guan 등의 연구에서 보고하였듯이 PDE-5i가 급성 허혈 상태에서도 국소적으로 신혈류량을 증가시켰기 때문으로 판단된다[32]. 또한 PDE-5i가 eNOS 활성화를 억제하고 세포내 기능성 단백질의 peroxynitrite 과정을 줄여준 것은, Jeong 등이 당뇨병성 신병증과 같은 활성 산소 스트레스 상태에서 PDE-5i를 사용하여 nitrotyrosine 발현을 감소 시킨 연구와 일치한다[18]. 그리고 TUNEL 염색의 비교에서도 손상 되었던 세뇨관 상피세포의 세포고사 과정을 의미 있게 줄여준 것으로 나타난다. 그러나 기대했던 PDE-5i의 강력한 혈관 확장작용과 NAC의 항산화 작용의 상승효과는 확인할 수 없었으며 PDE-5i와 NAC을 병합 투여한 실험군에서 PDE-5i 단독 투여군과 의미 있는 차이를 보이지 않는 것은 두 제제간에 길항작용이 없었다는 것을 의미한다.

Kukreja 등은 허혈성 손상을 받은 심근에서 PDE-5i가 iNOS 및 eNOS 발현을 증가시켜 세포고사 과정을 억제한다도 보고하였으며[19], Choi 등은 PDE-5i가 허혈-재관류 신손상 시에 iNOS와 eNOS 발현을 유도하여 손상을 감소시켰다고 보고하였다[20]. 그러나 다른 연구들에서 NOS 활성화는 세포 손상과 세포 고사를 유발한다는 보고도 있다[33-34]. 즉 iNOS 와 eNOS 활성화가 세포 대사과정과 신호전달계에 어떠한 영향을 미치는지는 아직 명확히 정립되지는 않았다고 볼 수 있다. 또한 PDE-5i가 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)를 통해 세포 내에 P38 MAPK, ERK1/2 인산화 과정, JNK/ATF2 과정, GSK-3β 억제 과정을 거쳐 항-세포고사 작용을 한다는 보고들도 있어서[17,19,21], PDE-5i의 항-세포고사 작용은 NOS 이외에도 다양한 세포내 신호전달계를 통해 이루어짐을 짐작할 수 있다. 그리고 본 연구에서와 같은 iNOS 와

eNOS 변화는 5/6 신절제술 시행 후 6-8주간 경과된 만성 신병증 상태의 신장에서 시행된 것이라는 점에서 기존 연구들과 다른 결과를 나타냈을 수도 있으며, 추가적으로 만성 신병증 상태에서의 NOS 활성화에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구가 필요하겠다.

전통적으로 신기능 평가에 사용되던 BUN과 크레아티닌은 신손상 2-3일 후 최고치에 도달한다[35]. 즉 급성으로 진행되는 신손상의 정도를 평가하기에는 한계가 있다는 점에는 많은 연구자들이 동의한다[22,35]. 예민도를 높이기 위해서, 일부 연구자들은 방사선 조영제 유발 신병증의 정의로 크레아티닌 절대치 상승을 0.3mg/dL으로 낮추거나 NGAL, cystatin C, KIM-1 (kidney injury molecule 1)과 같은 조기 신손상 표지자를 사용하자는 제안을 하고 있다[35-37]. NGAL은 주로 근위세뇨관 상피세포에 존재하며 손상이 발생하면 초기 2시간 내에 상승하고 6시간 내에 최고치에 이른다[35,36]. 그리고 cystatin C는 cysteine protease 길항제의 하나로 사구체에서 여과된 후 근위세뇨관에서 재흡수 되어 일정 속도로 이화과정을 거친다[35,37]. 따라서 사구체 여과율이 감소되거나 근위세뇨관의 손상되었을 때 cystatin C 혈중치가 상승하게 된다. 이들 신손상의 조기 표지자들을 측정하여 고전적인 인자들과 비교해 봤을 때, 모든 군에서 크레아티닌과 BUN이 실험 2일째 기저치보다 약간 상승하였다가 6일째에는 기저치보다 낮아지는 경향을 보이는 반면, cystatin C는 PDE-5i 투여군을 제외한 나머지 군에서 지속적으로 상승하였다. 크레아티닌 청소율은 실험 2일째는 기저치보다 상승하였으나 실험 4일째 기저치에 가깝게 회복되었으며 6일째는 다시 천천히 상승하여 각 군간에 차이를 보였다. 그리고 NGAL의 경우 실험 2일째 최고치에 도달하여 4일째까지 유지되다가 6일째 기저치로 감소하는 경향을 보였다. 조직학적 변화와 비교해 보면, 크레아티닌과 BUN은 실험 2일째 나타난 급성 세뇨관 괴사 정도 또는 실험 6일째 나타난 세뇨관 위축과 간질 섬유화 정도를 반영하지 못하고 있으나 cystatin C는 손상 이후 지속적으로 상승하여 신기능의 감소를 반영하였고 실험 6일째는 각 군간에 손상의 정도에 따라 유의한 차이를 보이고 있다. NGAL은 첫 48시간 경과 시에, 손상의 정도에 따라 실험군 간에 최고치 값에 유의한 차이가 있었으며 조직학적 변화와 잘 부합되었다. 그러나 최종 144시간 경과 후 각 실험군 간에는 차이를 보이지 않았다. 즉 크레아티닌과 BUN은 방사선 조영제에 의한 신손상을 측정하기에는 적절하지 않으며, NGAL은 초기 신손상에 대해서는 어느

표지자보다도 예민하지만 신손상에 따른 최종 예후를 반영하지 못하는 것을 알 수 있다. 또한 cystatin C는 NGAL과 같이 예민하지는 않지만 신손상에 따른 신기능의 변화를 비교적 잘 반영해 준다는 것을 알 수 있다. 그리고 전통적인 인자들을 통해 계산한 크레아티닌 청소율은 cystatin C와 유사한 경과를 보이고 있어 cystatin C와 더불어 방사선 조영제 유발 신병증에서 신기능 평가에 유용한 측정치로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

제5장 결 론

이상의 실험 결과를 토대로, PDE-5i 투여는 만성 신병증 상태의 신장에서 요오드 함유 조영제에 의한 초기 세뇨관 괴사를 완화해 주며, 후기 재생과정에서 염증반응과 세포고사를 억제하여 정상적인 해부학적 구조를 회복시켜 줄 수 있었다. 이러한 효과는 수입 세동맥에 대한 효과 이외에도 eNOS 발현을 억제하여 과도한 NO의 생성에 따른 세포내 단백질 손상을 완화해 주며, cGMP를 통한 세포내 신호전달계 과정을 거쳐 세포고사를 억제할 수 있다는 것일 보여준다. 항산화제인 NAC은 eNOS 발현 및 세포 고사 과정을 차단하는 효과는 확인할 수 없었으며 PDE-5i 와의 상승효과도 확인할 수 없었다. 이것은 방사선 조영제 유발 신병증에서 활성 산소의 역할보다는 조직의 허혈성 손상 정도와 2차적 재관류 손상에 따른 세포고사 과정이 더 중요한 역할을 한다고 볼 수도 있다. 그리고 크레아티닌 및 BUN과 같은 전통적인 신기능 평가 인자는 방사선 조영제에 의한 신손상을 적절하게 반영하지 못하며, NGAL과 같은 조기 신손상 표지자는 초기 최고치 값은 의미가 있으나 손상에 따른 예후를 예측하기에는 적절하지 않았다. 반면 cystatin C 와 크레아티닌 청소율은 시간 경과에 따라 신손상에 의한 신기능의 변화를 잘 반영하였다.

참고문헌

1. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002;**39**:930-936
2. Kooiman J, Klok FA, Mos ICM , Van Der Molen A, De Roos A, YSijpkens Y.W.J, Huisman M. V. Incidence and predictors of contrast-induced nephropathy following CT-angiography for clinically suspected acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost.* 2010;**8**:409-11
3. Gruberg L, Mintz GS, Mehran R. The prognostic implications of further renal function deterioration within 48 h of interventional coronary procedures in patients with pre-existent chronic renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol*. 2000;**36**:1542-1548
4. Rudnick M, Feldman H. Contrast-induced nephropathy: What are the true clinical consequences? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;**3**:263-272
5. Aronow HD, Peyser PA, Eagle KA. Predictors of length of stay after coronary stenting. *Am Heart J*. 2001;**142**:799-805
6. Pannu N, Manns B, Lee H, Tonelli M. Systematic review of the impact of N-acetylcysteine on contrast nephropathy. *Kidney Int*. 2004;**65**:1366-1374
7. Mueller C. Prevention of contrast-induced nephropathy with volume supplementation, *Kidney Int Suppl*. 2006;**100**:S16-S19
8. Merten GJ, Burgess WP, Gray LV. Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;**291**:2328-2334
9. Ozcan EE, Guneri S, Akdeniz B. Sodium bicarbonate, N-acetylcysteine, and saline for prevention of radio contrast-induced nephropathy: A comparison of 3 regimens for protecting contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary procedures. A single-center prospective controlled trial. *Am Heart J*. 2007; **154**:539-544.
10. Solomon R. Preventing contrast-induced nephropathy: problems,

challenges and future directions. *BMC Med.* 2009;**7**:24-33.

11. Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Radiocontrast induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction. *Kidney Int*. 1992;**41**:1408-1415
12. Mockel M, Radovic M, Kuhnle Y, Combe V, Waigand J, Schroder S, Dietz R, Frei U, Eckardt KU. Acute renal haemodynamic effects of radiocontrast media in patients undergoing left ventricular and coronary angiography. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;**23**:1588-1594
13. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;**3**:288-296
14. Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W . Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med*. 2000;**343**:180-184
15. Efrati S, Dishy V, Averbukh M, Blatt A, Krakover R, Weisgarten J, Morrow JD, Stein MC, Golik A. The effect of Nacetylcysteineon renal function, nitric oxide, and oxidative stress after angiography. *Kidney Int*. 2003;**64**:2182-2187
16. Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, Laurindo FR, Machado Cesar LA, Seguro AC.Renal effects of Nacetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy : decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;**19**:1803-1807
17. Xia Yong. How does Viagra protect the ischemic heart ?. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;**296**:H1209-H1210
18. Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lee SH, Moon JY, Lim SJ. Effects of Sildenafil on Oxidative and Inflammatory Injuries of the Kidney in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Am J Nephrol.* 2009;**29**:274-282
19. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L.

Pharmacological preconditioning with sildenafil : basic mechanisms and clinical implications. *Vascular Pharmacology*. 2005;**42**:219-232

20. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Chung S, Chang YK, Lee SJ, Na KR, Kim YS, Shin YT, Lee K W. Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;**297**:F362-F370
21. Das A, Salloum FN, Yuan LX, J. Rao J and Rakesh C. Kukreja. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2009;**296**:H1236-H1243
22. Persson PB, Tepel M. contrast medium-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;**20**:S8-10
23. Heyman SN, Khamaisi M, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2008;**28**:998-1006
24. Palm F, Friederich M, Carlsson PO, Hansell P, Teelink T, Liss P. Reduced nitric oxide in diabetic kidneys due to increased hepatic arginine metabolism: implications for renomedullary oxygen availability. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;**294**:F30-F37
25. Russo D, Minutolo R, Cianciaruso B, Memoli B, Conte G, De Nicola L. Early effects of contrast media on renal hemodynamics and tubular function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 1995;**6**:1451-1458
26. Pflueger A, Abramowitz D, Calvin AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus. *Med Sci Monit*. 2009;**15(6)**:RA125-136
27. Curtis LM, Agarwal A. Hope for contrast induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2007;**72**:907-909
28. Cronin RE. Contrast-induced nephropathy: Pathogenesis and prevention. *Pediatr Nephrol*. 2010;**25**:191-204

29. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;**268**:L699-L722

30. Viedt C, Orth SR. Monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1) in the kidney : does it more than simply attract monocytes?. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;**17**:2043-2047

31. Gong X, Celsi G, Carlsson K, Norgren S, Chen M. N-acetylcysteine amide protects renal proximal tubular epithelial cells against iohexol-induced apoptosis by blocking p38 MAPK and iNOS signaling. *Am J Nephrol*. 2010;**31**:178-188

32. Guan Z, Miller SB, Greenwald JE. Zaprinast accelerates recovery from established acute renal failure in the rat. *Kidney Int*. 1995;**47**:1569-1575

33. Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine induced nitric oxide dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38 MAP kinase. *Arch Oral Biol.* 2006;**51**:1048-1053

34. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int*. 2002;**61**:855-861

35. Walker SS, Bonventre JV. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*. 2008;**109(4)**:C192-C197

36. Hirsh R, Dent C, PFriem H, Allen J, Beekman RH, Ma Q, Dastrala S, Bennett M, Mitsnefes M, Devarajan P. NGAL in an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol*. 2007;**22**:2089-2095

37. Rickli H, Benou K, Ammann P, Fehr T, Brunner La Rocca HP, Petridis H Riesen W, Wuthrich RP. Time course of serial cystatin C levels in comparison with serum creatinine after application of radiocontrast media. *Clin Nephrol.* 2004;**61**:98-102

ABSTRACT

Phosphodiesterase- 5 inhibitor can ameliorate radiocontrast-induced nephropathy in rat model of chronic kidney disease

Jongmyeong Yu

Department of Medicine,

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung-Ok Choi)

Radiocontrast agent damages the renal tubules both by contracting renal arterioles and by direct toxic effect to tubular epitheliae. In recent reports, phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE-5i) are known to have not only vasodilative effect but also the anti-oxidative potentials. The aim of the present study was to investigate whether PDE-5i ameliorate radiocontrast-induced nephropathy (CIN) and N-acetylcysteine (NAC) which is used to prophylactic purpose to CIN popularly has true benefits and/or synergistic effects with PDE-5 inhibitors in rat model of chronic kidney disease.

48 male Sprague-Dawley rats were performed 5/6 nephrectomy and divided into 4 groups: vehicle, PDE-5i (1.5mg/kg, by cannula) treated group, NAC (60mg/kg, by cannula) treated group, and combination group. All rats received drugs 4 times every 12 hours. Radiocontrast agent (Iopromide 10ml/kg) was injected 1 hour after 3rd injection. Blood and 24 hours urine samples were taken every 48 hours for 6 days. Rats were sacrificed at 2nd day and 6th day of experiment. For functional assay, serum NGAL, cystatin C, BUN, and creatinine were measured and

creatinine clearances were calculated. iNOS, eNOS, and MCP-1, were measured and nitrotyrosine expression, and TUNEL stain were performed in kidney to estimate the oxidative stress, inflammatory response and apoptosis.

There were no significant changes of serum creatinine and BUN among the groups. But PDE-5i treated groups (0.43±0.13mg/ml/100g) and PDE-5i with NAC treated group (0.39±0.79mg/ml/100g) showed significant improvements of creatinine clearance compared to vehicle group (0.25±0.87 mg/ml/100g) at 6^{th} day. Serum NGAL significantly decreased in PDE-5i treated group (68.3±5.5 vs 82.79±11.25pg/ml, 64.1±10.1 vs 83.6±7.6pg/ml) and PDE-5i with NAC treated group (58.3±19.6 vs 82.79±11.25pg/ml, 53.8±19.3 vs 83.6±7.6pg/ml) compared to vehicle group at 2^{nd} and 4^{th} day respectively. Serum cystatin C also significantly decreased in PDE-5i treated group (5.28±0.9ng/ml) and PDE-5i with NAC treated group (5.8±0.66ng/ml) compared to vehicle group (7.53±1.3ng/ml) at 2^{nd} day. In kidney harvested at 2^{nd} day, eNOS expression was significantly decreased in PDE-5i treated group but there were no differences in iNOS expression among the groups. MCP-1 and nitrotyrosine expression decreased in PDE-5i and PDE-5i with NAC treated group. In kidney harvested at 6^{th} day, MCP-1 and nitrotyrosine expression increased in vehicle group and NAC treated group. TUNEL stain showed decreased apoptotic feature in PDE-5i and PDE-5i with NAC treated group but not in other groups at 2th day. At 6^{th} day, there were no differences in TUNEL staining among the groups

In conclusion, these results suggest that PDE-5i may prevent and ameliorate CIN via anti-oxidative and anti-apoptotic potentials, but there were no synergic effects of combination of PDE-5i and NAC on CIN.

Key Words: Radiocontrast media, Phosphodiesterase 5 inhibitor, Oxygen free radical, Apoptosis, NGAL, Cystatin C