대한이식학회지 : 제 13 권 제 1 호
Vol. 13, No. 1, June, 1999

□원 저□

신 세뇨관 상피세포에서 Cyclosporine A에 의한 세포사멸(Apoptosis)의 기전에 관한 연구

연세대학교 의과대학 1외과학교실, 2내과학교실, 3생화학교실

김순일1 · 최규헌2 · 정득림2 · 김경섭3

= **Abstract** =

The Study on the Mechanism of Cyclosporine A Induced Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells

Soon Il Kim, M.D.1, **Kyu Hun Choi,** M.D.2, **Deug Lim Chong,** M.S.2
and **Kyung Sup Kim,** M.D.3

Departments of 1Surgery, 2Internal Medicine and 3Biochemistry
Yonsei University College of Medicine

A major limiting factor in the use of cyclosporine A (CsA) is nephrotoxicity, but the mechanisms of nephrotoxicity are not fully understood. In order to elucidate the pathogenesis of CsA tubulotoxicity, we examined mechanisms (DNA synthesis, necrosis and apoptosis) of cellular injury induced by CsA in cultured LLC-PK1 renal tubular cell line. The possible role of Fas antigen in the mediation of CsA-induced cell death and the hypothesis that CsA-mediated injury activates the glucose transporter GLUT1, a stress response gene in renal tubular cells were also investigated. CsA treatment for 24 hours in LLC-PK1 cells showed significantly decreased 3H-thymidine uptake in a dose dependent manner (0.1 μg/ml to 1 mg/ml), indicating that DNA damage is a sensitive indicator of CsA induced nephrotoxicity. A dose of 10 μg/ml CsA caused a significant increase in LDH release (M∓S.D., 11.0∓3.0% vs 27.0∓9.8, $p<0.05$). On flow cytometric analysis, 9.9∓4.2% of control cells appeared in a region of decreased forward light scatter and increased side scatter, respectively. Both indices representing characteristics of apoptotic cell death. Compared to control, treatment with 10 ng/ml of CsA for 24 hours significantly increased the proportion of cells in apoptotic region to 38.9∓13.5%. This finding was supported by electrophoretic analysis of the DNA extracted from CsA-treated cells, where a series of bands corresponding to integer multiples of 180 to 200 base pairs was visualized. CsA (0.1 μg/ml) treatment for 24 hours was seen to cause a significant elevation in the expression of the 45 kD Fas protein by Western blot analysis. In addition, the exposure to CsA was also associated with an increase of GLUT1 protein levels up to 2.2 fold (mean) on Western blot analysis.

In conclusion, CsA is directly toxic to tubular cells with inhibiting DNA synthesis and inducing cell death in the form of necrosis or apoptosis. Fas antigen-ligand system and glucose transporter GLUT1 may play roles in mediating CsA induced tubular cytotoxicity.

Key Words: Cyclosporine A, Apoptosis, Fas, GLUT1, Renal tubular cell

책임저자 : 최규헌, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, **연세대학교 의과대학 내과학교실**, **우편번호**: 120-752
Tel: 02-361-5437

본 연구는 연세대학교 의과대학 1998년도 교수 연구비에 의하여 이루어졌음.

서 론

Cyclosporine A (CsA)는 말초혈액 T 림프구 가운데 helper (CD4) T 세포의 interleukin-2 생성을 억제하여 면역 억제 효과를 나타내므로서 장기이식 후 거부반응을 예방하기 위한 목적으로 쓰여지고 있으며 1978년 처음으로 임상에 적용된 이래 거의 모든 장기이식 후 필수 면역억제제로 사용되고 있다.[1] 다른 한편 심한 단백뇨를 보이는 minimal change nephrotic syndrome과 일부 focal segmental glomerulosclerosis 환자에서도 완전 관해 또는 부분 관해의 투여 효과가 보고[2]된 바 있어 신 증후군을 동반하는 사구체 신염의 치료제로서도 각광을 받는 약제이다.

그러나 CsA는 현저한 임상효과에 반하여 다양한 부작용을 가지고 있으며 그 중에서도 신기능 저하를 초래하는 신독성이 이 약제의 장기적인 사용에 가장 큰 제약이 되고 있다.[3,4] CsA 신독성은 급격한 신기능의 저하는 물론이고 신 세뇨관의 기능 이상을 반영하는 고칼륨 혈증을 비롯하여 세뇨관의 간질성 퇴행과 섬유화를 유발하여 CsA의 지속적인 복용이 필수적인 신장 이식 환자에서 지속적인 이식신 소실의 중요한 요인의 하나로 알려져 있다.[1] 그간 CsA 신독성에 대한 많은 연구[4,5]가 있었으나 그 기전은 아직 명확히 규명되어 있지 않다. 이식신에서 CsA 신독성의 가장 특징적인 소견은 신 혈관의 수축으로 특히 세동맥의 수축이 현저하고,[4] 초기의 혈관 변화와 함께 세뇨관 상피 세포의 손상, 세뇨관 괴사 등이 동반되며 병변이 진행되는 경우에는 사구체나 세동맥 내의 혈전, 국소성 사구체 경화와 함께 세뇨관 위축, 간질의 섬유화 등이 관찰된다.[5] 따라서 CsA 신독성은 혈관 수축에 따른 혈류 저하로 인한 세포 허혈과 CsA에 의한 직접적인 세포 손상의 두 가지로 구분할 수 있으며 CsA 투여에 따른 주된 병변이 세뇨관 및 간질에서 발견되므로 신 세뇨관 상피 세포가 손상에 노출되는 주된 세포가 될 것으로 추정된다. 특히 Rubin-Kelley와 Jevnikar[6]는 신 세뇨관 상피 세포가 간질 손상의 주된 항원 소개(antigen presenting) 세포임을 보고한 바 있어 이식신에서도 신 세뇨관 상피 세포의 일부 또는 전반적인 손상이 CsA에 의하여 매개될 것으로 추정된다.

신 세뇨관 상피세포의 손상은 괴사(necrosis)와 세포사멸(apoptosis)로 구분될 수 있다.[7,8] 괴사는 손상에 따른 일반적인 세포 파괴 과정임에 비하여 세포사멸은 능동적인 세포 손상 기전으로 상피 세포들의 손상에서 보다 현저하며, 상피 세포들로 구성된 세뇨관 손상에서 손상 유발 원인에 따라서는 괴사보다 세포사멸이 보다 현저한 손상을 초래할 수 있다.[9] 특히 신 세뇨관 상피 세포의 세포사멸은 저 산소성 손상을 비롯하여 $HgCl_2$, Cis-platin, actinomycin D 등의 약제에 의한 손상에서 현저하게 나타나는 것으로 알려져 있다.[9,10] CsA에 의한 손상 기전 중 하나가 허혈임을 고려할 때 저 산소성 손상에서 세포사멸이 중요할 역할을 하므로 역시 세뇨관 손상을 유발하는 CsA 신독성의 기전에도 세포사멸이 관여할 것으로 예상된다. 그러나 배양된 신 세뇨관 상피세포에서 CsA 투여에 따른 세포 사멸에 대한 연구 드물다.

이에 본 연구자는 CsA 신독성의 기전의 하나로 세포 사멸에 의한 매개 가능성과 그 기전을 규명하기 위하여 배양된 신 세뇨관 상피 세포를 대상으로 CsA 노출에 따른 DNA 합성, 괴사 및 세포 사멸 여부를 실험하고, 세포 사멸의 기전으로 Fas 항원 및 방어 기전으로 긴장성 유전자(stress gene)인 당 이동체(glucose transporter) GLUT1의 발현을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대상 및 방법

1) 시 약

우태아 혈청과 minimum essential medium (MEM) 분말은 GIBCO Co. (Grand Island, NY. USA)로부터 구입하였으며, CsA와 세포 배양에 필요한 시약은 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO. USA)로 구입하여 사용하였다. Fas와 GLUT1 항체는 Santa Cruz Biotechnology Co. (Santa Cruz, CA. USA) 제품을 사용하였다.

2) 방 법

(1) 신 세뇨관 상피세포의 배양: 신 세뇨관 상피세포는 American Tissue Culture Collection (Rockville, MD. USA)로부터 LLC-PK1 세포주(CRL-1392)를 분주받아 실험하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO)에 얼린 세포를 37℃에서 녹여 5% 우태아 혈청, 100U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 함유된 pH 7.4의

MEM 배양액을 넣고 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양한 다음 약 1주 후부터 7 10일 간격으로 trypsin/EDTA를 사용하여 계대 배양하여 계대배양 3 30회의 세포를 사용하였다. CsA는 DMSO에 녹여 100 mg/ml (83 mM)의 stock solution으로 −20℃에 보관하며 실험에 따라 희석하여 배지에 첨가하여 실험하였다.

(2) 세포 손상의 평가: 세포 손상의 정도는 CsA 노출후 3H-thymidine uptake를 이용하여 DNA 합성에 미치는 영향과 배지내로 유리되는 lactate dehydrogenase (LDH)를 측정하여 평가하였다. 3H-thymidine uptake은 세포를 96 well 배양기에 1×104 cells/well로 분주하고 5% 우태아 혈청으로 자극하고 대조군은 CsA를 일정 농도로 첨가하여 24시간 배양한 다음 6시간 동안 1 μCi/well이 되도록 3H-thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL. USA)을 첨가하여 배양하였다. 이어 세포들을 cell harvester (Titertek Cell Harvester 550, Flow laboratories, Irvine, Scotland, UK)로 glass microfiber filter paper에 흡착시킨 다음 scintillation 액과 함께 β-counter로 방사능을 측정하였다. LDH는 Hitachi 747 (Hitachi, Tokyo Japan)로 측정하였으며, 수거한 배지를 200 g에서 5분간 원침한 후 상층액을 4℃에 보관하고 남은 세포들을 균등화시켜 유리된 LDH와 상층액내의 LDH를 각각 측정하여 상층액과 균등액내 LDH의 합을 전체 LDH로 하여 상층액내 LDH를 percentage (%)로 산정하였다.

(3) 유 세포분석(Flow cytometry)을 이용한 세포사멸의 평가: Choi등[11]의 방법에 따라 실험하였다. 세포를 6 well plate에 1×106 cells/ml로 분주하고 CsA에 노출시켜 24시간 동안 배양한 다음 상층액을 수거하여 200 g에서 5분간 원침하여 침전된 세포진을 보관하고 배양 용기에 남은 세포들을 부유시켜 다시 원침한 후 phosphate buffered saline (PBS)에 재 부유시켜 PBS : propidium iodide를 1 : 1로 첨가한 다음 flow cytometry를 이용하여 FACStar plus (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 분석하여 세포의 크기와 propidium iodide 염색 정도에 따라 분석하여 1구역내 세포수를 세포사멸된 세포들로 평가하였다.

(4) DNA 분절(fragmentation) 평가: Peralta등[12]의 방법을 일부 수정하여 실험하였다. Flow cytometry 측정에서와 동일한 조건으로 분주, 실험한 다음 6 well plate로부터 세포들을 이탈시켜 PBS 부유액을 만든 다음 1500 g에서 5분간 원침하여 세포진(cell pellet)을 만든다. 세포진을 10 mM EDTA가 함유된 $Ca2^{+}$, $Mg2^{+}$-free PBS에 재부유 시킨다음 4℃에서 pipetting하여 cell plug을 만든 다음 lysis buffer (0.2% SDS, 50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 200 μg/ml proteinase K, pH 7.6)를 첨가하여 42℃에서 overnight 배양하고나서 phenol-choroform-isoamyl 방법으로 DNA를 추출하였다. Lysis buffer와 동일한 부피의 phenol-chloroform-isoamyl (25 : 24 : 1)을 가하여 2분간 심하게 섞은 후 12,000 g에서 2분간 원심분리한 다음 상층액에 3 M sodium acetate와 100% ethanol을 첨가하여 −70℃에서 2시간 동안 반응시키고 13,000 g에서 20분간 원침하여 DNA를 침전시켰다. DNA pellet을 70% Ethanol로 세척하고 최종 남은 pellet을 RNAse A를 함유한 Tris/EDTA 용액으로 37℃에서 30분간 용해시킨 후 1.5% agarose gel에서 standard와 같이 전기영동하여 ethidium bromide로 검색하였다.

(5) Fas 항원 발현의 평가: Yokoyama등[13]의 방법을 참고하여 세포를 1×106 cells/ml의 빈도로 100 mm dish에 분주하고 confluency를 이룬 후 CsA을 첨가하여 실험하였다. Rubber policeman을 사용하여 dish로부터 세포를 이탈시켜 원심 분리하여 세포진을 얻은후 PBS 용액으로 세척하고나서 protease inhibitor cocktail이 함유된 Lysis buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 50 mM Tris, 0.1% SDS, pH 8.0)를 가하여 1시간 동안 얼음위에서 반응시킨 다음 12,000 g에서 10분간 원침한 상층액을 10% SDS-PAGE에서 size별로 분리하여 western blot을 실시하였다. 분리된 단백을 Bradford 방법으로 단백 농도를 측정한 후 Immobilon filter에 100 mA로 overnight transfer한 다음 5% nonfat milk가 함유된 Tris-buffered saline-Tween buffer (TBST)의 blocking buffer와 배양하고나서 실온에서 인 Fas 단백의 carboxy terminal 종말 단백에 대한 가토 polyclonal 항체(Santa cruz, CA, USA)를 1000배 희석한 용액으로 상온에서 1시간 반응시킨 다음 membrane을 5분씩 3회 TBST 완충용액으로 세척하고나서 다시 TBST 완충용액에 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated Ab (Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England)를 5,000배 희석한 용액에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 동일한 방법으로 다시 세척하고 나서

ECL plus western blot detection system (Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England)을 사용하여 반응시킨 후 ECL film에 노출시켜 현상하였다.

(6) Glucose transporter GLUT1 발현: Dominguez 등[14]의 방법을 참고하여 Fas 항원의 발현 검사와 유사하게 Western blot 평가를 실시하였다. 배양된 세포를 1×106 cells/ml의 빈도로 100 mm dish에 분주하고 CsA에 노출시킨 다음 세포를 이탈시켜 1 μl의 protease inhibitor가 함유된 TES-PI buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 255 mM sucrose, 1% Triton X-100, pH 7.4)로 모든 세포를 용해한 다음 100 μl을 10% SDS-PAGE에서 size 별로 분리하여 western blot을 실시하였다. 실온에서 백서 GLUT1 carboxy terminal 종말 단백에 대한 가토 polyclonal 항체(연세의대 생화학교실 김경섭 교수)를 사용하여 Fas 항원 발현의 평가와 동일하게 western blot을 실시하였다.

(7) 통계학적 처리: 실험 결과는 평균∓표준 편차로 표시하였으며, ANOVA one-way analysis에서 Scheffe's F-test를 이용한 통계 분석에서 $p<0.05$에 유의성을 두었다.

결 과

1) CsA에 의한 LLC-PK1 세포 손상

CsA 노출에 따른 LLC-PK1 세포 손상의 척도로서 3H-thymidine uptake은 5% 우태아 혈청하에서 배양한 대조군에 비하여 CsA 0.1 μg/ml의 농도에서도 24시간 노출시 현저히 저하되었으며(4045.5∓385.7 cpm/well vs 1560.0∓211.8, $p<0.05$, Table 1), 그 이상의 농도에서 농도 의존성으로 유의한 억제를 보였다. 세포막 손상을 반영하는 LDH 유리는 CsA 10 μg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 의의있게 증가하였으며(11.0∓3.0% vs 27.0∓9.8, $p<0.05$, Table 1), 그 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 지속적인 상승을 보였다. CsA 노출 시간(6, 12, 24, 48시간)에 따른 3H-thymidine uptake과 LDH 유리 실험에서는 24시간에서 가장 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다.

2) CsA에 의한 세포 사멸

CsA 노출에 따른 세포사멸은 유세포 분석에서 세포 크기의 감소와 세포내 과립성(granularity)의 증가를 세포사멸된 세포로 평가하여 forward light scatter의 감소와 side scatter의 증가로 표현되는 구역내 세포수를 전체 세포수에 대한 비율(%)로 표시하였다. CsA는 10 μg/ml의 농도에 24시간 노출 시 세포사멸 구역내 세포비율이 대조군 9.9∓4.2%에 비하여 38.9∓13.5로 의의있게 증가하였으며, 1 mg/ml의 농도에서 72.5∓11.7%까지 현저한 증가를 보였다(Fig. 1). 유세포 분석의 실험과 동일한 농도의 CsA로 처리한 세포로부터 추출한 DNA의 gel 전기 영동 실험에서 200 base pair 크기의 분절된 DNA 양상을 보여 세포사멸된 변화를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 세포사멸된 DNA 양상은 10 μg/ml의 cycloheximide를 추가함으로서 보다 뚜렷이 확인할 수 있었다.

Table 1. Effects of cyclosporine A on DNA synthesis and lactate dehydrogenase release in LLC-PK1 cells

	3H-thymidine uptake (cpm/well)	LDH release (%)
Control[1]	4045.5∓385.7	11.0∓3.0
CsA (μg/ml)		
0.1	1560.0∓211.8*	12.5∓8.3
1	974.6∓199.2*	14.3∓11.5
10	327.6∓87.8*	27.0∓9.8*
100	100.7∓45.0*	45.5∓15.9*
1000	80.3∓17.1*	68.8∓21.7*

[1]5% fetal calf serum
*$p<0.05$, vs control

Table 2. Effects of cyclosporine A on apoptosis in LLC-PK1 cells

	% Apoptosis
Control	15.4∓7.2
CsA (μg/ml)	
0.1	13.8∓8.8
1	18.3∓6.7
10	38.9∓13.5*
100	51.6∓8.4*
1000	72.5∓11.7*

*$p<0.05$, vs control

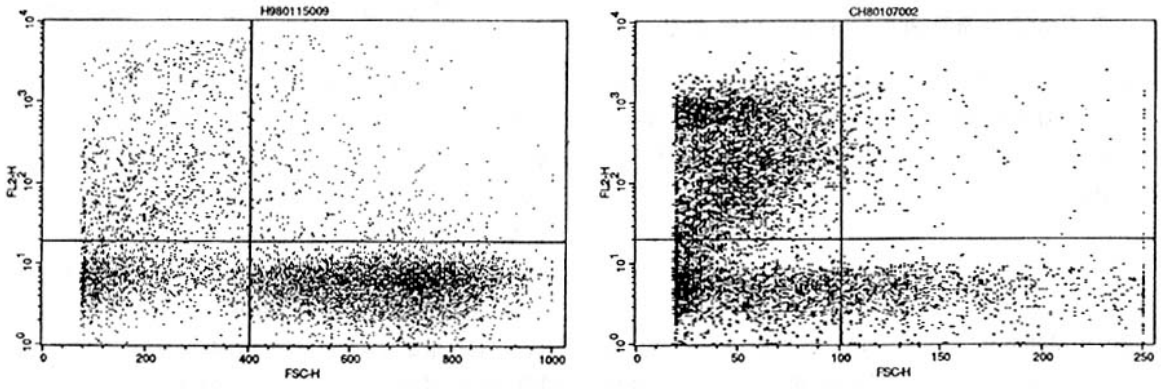

Fig. 1. Flow cytometric assessment of the effects of cyclosporine A on the size and granularity of LLC-PK1 cells. On flow cytometric analysis, approximately 17% of control cells appeared in a region of decreased forward light scatter (FSC) and increased side scatter (SSC), respectively, both indices representing characteristics of apoptotic cell death. Treatment with 10 ng/ml of CsA for 24 hours increased the proportion of cells in apoptotic region to 45%.

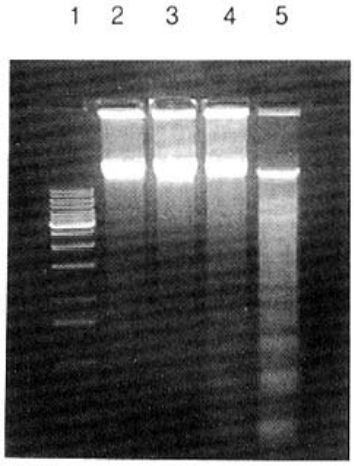

Fig. 2. The effect of cyclosporine A on DNA fragmentation in LLC-PK1 cells. Lane 1: 123-base pair standard ladder; lane 2: control; lane 3: CsA 1 ng/ml; lane 4: CsA 10 ng/ml lane 5: CsA 10 ng/ml +cycloheximide 10 μg/ml. Gel electrophoresis of the DNA extracted from CsA-treated cells showed a series of bands corresponding to integer multiples of 180 to 200 base pairs.

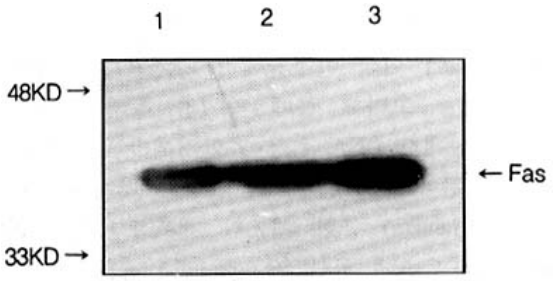

Fig. 3. Western blot analysis of Fas expression in cyclosporine A-treated LLC-PK1 cells. Lane 1: control; lane 2: CsA 1 ng/m; lane 3: CsA 100 ng/ml. CsA (100 ng/ml) treatment for 24 hours was seen to cause a significant increase in the expression of the 45 kD Fas protein in LLC-PK1 cells.

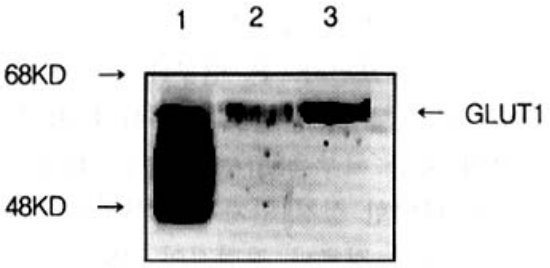

Fig. 4. Western blot analysis of GLUT1 in cyclosporine A-treated LLC-PK1 cells. Lane 1: RBC (positive control); lane 2: control; lane 3: CsA 100 ng/ml. The exposure of LLC-PK1 cells to CsA (100 ng/ml) for 4 hours was associated with an increase of GLUT1 protein.

3) CsA에 노출된 세포에서 Fas의 발현

CsA에 노출된 세포에서 Western blot 분석을 통한 Fas 단백의 발현 실험에서 0.1 μg/ml의 CsA에 24시간 동안 처리한 경우 Fas 단백의 발현의 현저한 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

4) CsA에 노출된 세포에서 GLUT1의 발현

Western blot 분석으로 CsA에 노출된 세포의 당이동체 GLUT1 단백의 발현 실험에서 CsA 0.1 μg/ml의 농도에서 GLUT1 단백의 발현이 약 2.2배 증가하였다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 CsA에 의한 세뇨관 세포 손상의 매개 기전으로 직접적인 세뇨관 세포 손상의 가능성을 실험한 결과, CsA에 노출시 신 세뇨관 세포의 DNA 합성의 저하를 관찰하였다. 특히 일반적인 조직내 농도이하에서도 현저한 억제를 보여 세뇨관 세포의 DNA 합성이 CsA에 의한 손상에 대한 매우 예민한 지표가 될 수 있음을 제시하는 결과로 생각된다. 또한 농도 의존적 억제를 보여 지속적으로 저농도에 노출되더라도 축적에 따른 손상 가능성을 예상할 수 있어 이식 환자들에서 장기간 투여되어야 한다는 점을 고려해 볼때 장기간 투여에 따르는 CsA 신독성에서 DNA 손상이 현저해질 수 있을 것으로 추정된다. 이러한 DNA 합성의 억제는 Blaehr 등[15]도 인(human) 근위 세뇨관 세포를 대상으로한 실험에서도 CsA에 의한 ^{3}H-thymidine uptake의 억제 효과를 관찰한 바 있다. Healy등[16]은 세뇨관 세포에서 CsA에 노출되면 G0/G1 시기에서 정지되며 S, G2/M 시기의 세포수의 농도 의존적 감소를 보고하여 본 연구의 DNA 합성의 억제 효과와 일치하는 결과로 생각된다.

CsA에 의한 DNA 합성의 억제 기전은 친 지질성으로 세포막을 통과한 CsA에 의하여 다양한 성장인자들에 의한 세포내 신호전달 경로를 차단함으로서 초래될 것으로 사료된다. 본 연구에서는 우태아 혈청을 DNA 합성 유발 물질로 사용하여 특정 신호전달 경로의 차단 여부를 규명할 수는 없었으나 우태아 혈청내 다양한 성장 인자가 포함되어 있으므로 신호 전달의 최종 경로나 직접적인 DNA에 대한 손상의 효과일 것으로 추정할 수 있다. Skorecki등[17]은 사구체 메산지움 세포에서 vasopressin에 의한 phospholipase C 활성화 억제를 보고하였으며, 최등[18]도 PDGF에 의한 PLA2 활동도의 저하를 보고한 바 있어 유사한 기전에 의하여 CsA에 의하여 성장 인자에 의한 세뇨관 세포내 DNA 합성이 억제될 것으로 추정된다.

본 연구의 대상 세포인 LLC-PK1 세포는 돼지의 신 세뇨관 상피세포주로서 주로 근위 세뇨관 상피세포의 특성을 갖는다.[10,12,16] LLC-PK1 세포는 세뇨관 세포에 대한 연구 대상 세포로 널리 사용되고 있으며 특히 이동 특성을 유지하여 세뇨관 기능의 연구에서도 많이 사용되는 세포주이다. 본 연구에서 CsA 농도를 점차 높여 실험한 결과 10 μg/ml의 농도에서는 세포 밖으로 유리되는 LDH 양으로 괴사를 평가한 결과 현저한 증가를 보여 DNA 합성의 저하와 함께 직접적인 세뇨관 세포 손상의 근거로 판단된다. 따라서 10 μg/ml의 농도에 24시간 이상 노출은 세포막의 손상과 함께 직접적인 괴사를 초래할 것으로 예상된다. Blaehr등[15]은 DNA 합성의 억제는 관찰하였으나 1 μg/ml의 농도에서는 가역적인 손상으로 보고하였으며, 본 연구에서도 1 μg/ml의 농도에서는 LDH의 유리가 관찰되지 않아 이들의 실험을 뒷받침하는 결과로 사료되며 CsA의 직접적인 손상은 농도 의존적 손상으로 생각된다.

세뇨관 세포의 손상은 회복이 가능한 상태에서 괴사에 이르기까지 다양하며 손상의 정도에 따라 결정된다.[5,19] 괴사보다 손상의 정도는 약하며 능동적인 세포 손상으로 세포사멸이 초래되는데 본 연구에서는 CsA 10 g/ml에서 LLC-PK1 세포의 세포사멸이 유발됨을 관찰할 수 있었다. CsA에 의한 배양된 세뇨관 세포를 대상으로한 세포사멸에 대한 연구는 매우 드물며 최근 Healy등[16]이 4.2 nM에서 세포사멸이 유발됨을 보고한 바 있어 본 연구와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 10 μg/ml (8.3 nM)로 다소 높은 농도에서 유발되었다. 세포사멸 된 세포는 조직 내에서 신속히 제거되므로 규명이 어려운 반면 본 연구에서는 DNA 분절로도 확인하여 CsA에 의한 세포사멸 가능성을 더욱 뒷받침하는 결과로 생각된다. 따라서 CsA 신독성에서 농도 의존적으로 괴사와 함께 세포사멸 또한 세뇨관 세포 독성을 매개하는 기전의 하나로 사료된다. Liberthal등[19]은 cis-platin, $HgCl_2$ 등의 약제의 세뇨관 세포 손상의 기전으로 세포사멸을 제시한 바 있어, 본 연구는 CsA 유발 세뇨관 세포 손상에서도 세포사멸이 손상 매개 기전의 하나가 될 수 있음을 반영하는 결과로 판단된다.

CsA에 의한 신 세뇨관 상피 세포의 세포사멸 유

발 기전으로 우선 세포내 칼슘의 상승을 들 수 있다. 세포내 칼슘의 증가시 신경원 세포 등에서 세포사멸이 초래됨은 잘 알려져 있으며,[8,20] 혈관 평활근 세포와 메산지움 세포에서도 1 μg/ml의 CsA 투여시 세포질내 칼슘의 상승이 보고[21,22]된 바 있어, 신 세뇨관 상피 세포내 칼슘도 상승할 것으로 추정되며 이에 따른 세포사멸의 유발 가능성을 추정할 수 있다. 칼슘의 상승은 세포질에 존재하는 칼슘 의존성 효소들의 활성화를 유발할 것으로 추정되며 세포 사멸에 관여하는 대표적인 효소로서 ICE (interleukin-1 β converting enzyme), calpain 등의 protease를 들 수 있으며,[20] 본 연구에서 DNA 분절 현상을 관찰할 수 있어서 최종적으로 칼슘 의존성 DNA endonuclease의 활성화가 초래되는 것으로 사료된다. Williams와 Smith[23]는 DNA 손상 시 p53 종양 억제 유전자가 발현, 활성화되고 그 결과로 세포 주기상 G0/G1 시기에서 정지되면서 손상의 복구 등이 일어나는데 회복되지 않는 경우 세포사멸이 초래될 수 있음을 보고하여 본 연구에서도 DNA 억제와 세포사멸이 같이 초래되므로 이와 유사한 기전에 의하여 세포사멸이 유발 될 수 있을 것으로 추정된다.

세포사멸은 수용체를 통한 세포사멸 자극의 전달이 필수적이며 이어서 관련된 c-Myc, Bcl-2 등의 유전자들의 발현에 의하여 진행되는데, 대표적으로 TNF receptor superfamily의 하나인 Fas 단백을 들 수 있다.[7,24] Fas 단백은 NK cell, T 림프구에서 세포사멸을 유발함은 잘 알려져 있으며, CsA 투여로 림프구의 Fas 단백 발현이 촉진된다.[8,12] 또한 Yokoyama등[13]은 배양된 간세포에서 CsA 투여 후 Fas 단백의 발현을 보고하여, CsA 투여에 의한 신 세뇨관 세포의 세포사멸 시 Fas 단백의 발현이 증가할 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 CsA 투여에 따른 45 kD의 세포막 수용체 Fas (APO-1/CD95)의 발현의 증가를 관찰하여 CsA 유발 세포사멸시 Fas 단백계에 의한 매개가 추정되나 항 Fas 단백, ligand에 대한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구에서 세포사멸 시 DNA 분절 효과는 cycloheximide의 투여로 보다 현저해짐을 관찰할 수 있어 TNF-α에 의한 세포사멸과 유사한 결과로서 CsA 유발 세포사멸의 추가 기전으로 TNF-α에 의한 직접적인 매개 가능성 또는 TNF 수용체군인 Fas 단백에 의한 매개 가능성을 좀더 뒷받침하는 실험 결과로 사료된다.

세포사멸이나 괴사와 같은 세포 손상에 대한 방어 기전의 하나로 최근에 Dominguez등[14]은 당이동체 GLUT1 단백의 발현 증가를 제시하였다. 당 자체가 세포의 중요한 에너지원이며 신 세뇨관 상피 세포는 세뇨관 강과 혈관 쪽의 기저막이 모두 당에 노출되어 있으므로 손상에 따른 세포내로의 당 유입의 증가를 예상할 수 있으며 이동 경로로 GLUT1 단백의 발현이 증가됨을 예상할 수 있다.[25] Song등[25]은 GLUT1 억제제인 phloretin의 투여로 젖산(lactate) 생성으로 평가한 CsA 투여에 따른 세뇨관 세포 손상을 방지할 수 있음을 보고하여 GLUT1 단백의 역할이 CsA 유발 세뇨관 세포의 손상에 중요함을 강조하였다. 본 연구에서도 CsA 0.1 μg/ml의 농도에 노출된 세뇨관 세포의 GLUT1 단백의 발현을 관찰할 수 있어 이를 뒷받침하는 결과로 생각된다. Dominguez등[14]은 신 세뇨관 상피 세포에서 칼슘 증가에 의한 손상 시 초기에 GLUT1의 발현이 증가함을 보고한 바 있으며, CsA 투여 시 세포내 칼슘의 증가가 보고[21]된 바 있으므로 CsA 투여에 따른 칼슘의 증가로 인한 GLUT1 단백 발현이 증가되는 것으로 추정된다. Singh등[26]은 calcineurin 억제제인 deltamethrin 또한 세뇨관 세포에서 GLUT1 단백의 발현을 증가시킴을 보고하면서 당 소모율은 변화 없음을 관찰한 바 있어, 동일한 기전으로 calcineurin 억제제인 CsA에 의한 GLUT1 단백 발현의 증가를 추정할 수 있으나 당 소모율에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

GLUT1 단백 발현의 증가 기전으로 전사(transcription)전, 후의 기전에 의한 여부는 추가 실험을 통한 규명이 필요할 것으로 사료된다. 또한 당 이동체의 증가로 세포내 당 유입의 증가 가능성은 높지만 실제 세포내 당 유입 및 대사의 변화가 CsA에 의한 세뇨관 세포 손상에 미치는 영향은 좀더 규명되어야 할 것으로 판단된다. CsA 투여에 따른 당이동체 GLUT1 단백의 발현은 CsA 투여에 따른 세뇨관 세포 손상의 방어 기전으로서의 가능성과 함께 CsA 장기간 신독성에서의 변화와 당뇨 환자가 신이식을 받은 경우를 고려해 볼 때 향후 집중적인 연구 과제의 하나가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

CsA 신독성의 기전의 하나로 세포 사멸에 의한

매개 가능성과 그 기전을 규명하기 위하여 배양된 신 세뇨관 상피 세포를 대상으로 CsA 노출에 따른 DNA 합성, 괴사 및 세포 사멸 여부를 실험하고, 세포 사멸의 기전으로 Fas 항원 및 방어 기전으로 긴장성 유전자(stress gene)인 당 이동체(glucose transporter) GLUT1의 발현을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) CsA 0.1 μg/ml의 농도에 24시간 노출 시 3H-thymidine uptake은 5% 우태아 혈청하에서 배양한 대조군에 비하여 현저히 저하되었으며(4045.5∓385.7 cpm/well vs 1560.0∓211.8, p＜0.05), 그 이상의 농도에서 농도 의존성의 유의한 억제를 보였다.

2) LDH 유리는 CsA 0.1 μg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 의의있게 증가하였으며(11.0∓3.0% vs 27.0∓9.8, p＜0.05, Table 1), 그 이상의 농도에서 농도 의존적으로 지속적인 상승을 보였다.

3) 유세포 분석을 통한 CsA 노출에 따른 세포사멸은 세포 크기의 감소와 세포내 과립성의 증가를 세포사멸된 세포로 평가하여, CsA 10 μg/ml의 농도에 24시간 노출시 세포사멸구역내 세포비율이 대조군 15.4∓7.2%에 비하여 38.9∓13.5로 의의있게 증가하였으며, 1 mg/ml의 농도에서 72.5∓11.7%까지 현저한 증가를 보였다.

4) 유세포 분석의 실험과 동일한 농도의 CsA로 처리한 세포로부터 추출한 DNA의 gel 전기 영동 실험에서도 200 base pair 크기로 분절된 세포사멸된 변화를 보였다. 세포사멸된 DNA 양상은 10 μg/ml의 cycloheximide를 추가함으로서 보다 뚜렷이 확인할 수 있었다.

5) Fas 단백은 CsA 0.1 μg/ml에 24시간 동안 노출된 세포에서 Western blot 분석상 현저한 증가를 관찰할 수 있었다.

4) CsA에 노출된 세포의 당이동체 GLUT1 단백의 발현에 대한 Western blot 분석상 약 2배의 GLUT1 단백 발현의 증가를 보였다.

이상의 결과로 보아 CsA는 신세뇨관 상피 세포에 대하여 DNA 합성을 억제하며 세포사멸 및 괴사를 일으켜 직접적인 손상을 유발하는 것으로 판단되며 CsA 신독성의 매개 기전의 하나가 될 것으로 사료된다. 또한 CsA 유발 세포사멸의 매개 기전으로 Fas 단백의 발현과 손상 방어 기전으로 당 이동체 GLUT1 단백의 발현의 증가가 추정되나, Fas antigen-ligand 계와 당이동능의 증가에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) Myers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, Leutscher J, Whitney DJ, Krasny D, Cplon NS, Perlroth M: The longterm course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. Kidney Int 33: 590, 1988
2) 강종명, 김성권, 이호영, 이정상, 김명재: 성인 미세변화 신증후군에서의 Cyclosporine의 치료 효과. 대한신장학회잡지 11: 359, 1992
3) Myers BD: Cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int 36: 964-974, 1986
4) Barros EJG, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schnor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation in cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int 32: 19-25, 1987
5) Kopp JB, Klotman PE: Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. J Am Soc Nephrol 1: 162-179, 1990
6) Rubin-Kelley VE, Jevnikar AM: Antigen presentation by renal tubular epithelial cells. J Am Soc Nephrol 2: 13-26, 1991
7) Zager RA: Pathogenic mechanisms in nephrotoxic acute renal failure. Sem Nephrol 17: 3-14, 1997
8) Savill J: Apoptosis and the kidney. J Am Soc Nephrol 5: 12-21, 1994
9) Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. Am J Physiol 271: F477-F488, 1996
10) Duncan-Achanzar KB, Jones JT, Burke MF, Carter DE, Laird HE: Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. J Pharmacol Exp Ther 277: 1726-1732, 1996
11) Kyu Hun Choi, Shin Wook Kang, Ho Yung Lee, Dae Suk Han: The effects of high glucose concentration on angiotensin II- or transforming growth factor-β-induced DNA synthesis, hypertrophy and collagen synthesis in cultured rat mesangial cells. Yonsei Med J 37: 302-311, 1996
12) Peralta Soler A, Mulin JM, Knudsen KA, Marano CW: Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. Am J Physiol 270: F869-F879, 1996
13) Yokoyama I, Hayakawa A, Hayashi S, Kobayashi T,

Negita M, Katayama A, Nagasaka R, Nami Y, Kojima T, Koike C, Uchida K, Takagi H: Fas antigen expression and apoptosis induction of in vitro cultured hepatocytes with high concentrations of cyclosporine A. Transplant Proc 28: 1383-1384, 1996

14) Dominguez JH, Song B, Liu-Chen S, Qulali M, Howard R, Lee CH: Studies of renal injury II. Activation of the glucose transporter 1 (GLUT1) gene and glycolysis in LLC-PK1 cells under $Ca2^{+}$ stress. J Clin Invest 98: 395-404, 1996
15) Blaehr H, Andersen CB, Ladefoged J: Acute effects of FK506 and cyclosporine A on cultured human proximal tubular cells. Eur J Pharmacol 231: 283-288, 1993
16) Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP: Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. Kidney Int 54: 1955-1966, 1998
17) Skorecki KL, Rutledge WP, Schrier RW: Acute cyclosporine nephrotoxicity-prototype for a renal membrane signalling disorder) Kidney Int 42: 1-10, 1992
18) 최규헌, 이승우, 강신욱, 이호영, 한대석: cyclosporine A가 PDGF 및 IL-1α 유발 메산지움 세포내 cytosolic 및 group-II secretory phospholipase A2 활동도에 미치는 영향. 대한신장학회지 15: 458-469, 1996
19) Lieberthal W, Triaca V, Levine JS: Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. Am J Physiol 270: F700-F708, 1996
20) Squier MKT, Miller ACK, Malkinson AM, Cohen JJ: Calpain activation in apoptosis. J Cell Physiol 159: 229-237, 1994
21) Meyer-Lehnert H, Schrier RW: Cyclosporin A enhances vasopressin-induced $Ca2^{+}$ mobilization and contraction in mesangial cells. Kidney Int 34: 89-97, 1988
22) Pfeilschifter J: Cyclosporin A augments vasoconstrictor-induced rise in intracellular free calcium in rat mesangial cells. Biochem Pharmacol 37: 4205-4210, 1988
23) Williams GT, Smith CA: Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. Cell 74: 777-779, 1993
24) Yu K, Chen Q, Liu H, Zhan Y, Stevens JL: Signalling the molecular stress response to nephrotoxic and mutagenic cysteine conjugates: Differential roles for protein synthesis and calcium in the induction of c-fos and c-myc mRNA in LLC-PK1 cells. J Cell Physiol 161: 303-311, 1994
25) Song B, Singh G, Dominguez JH: Activation of GLUT1 gene and glycolysis reduce cytotoxicity after cyclosporine A injury in LLCPK1 cells. Am J Soc Nephrol 8: (Abstract)1834, 1997
26) Singh G, Song B, Dominguez JH: Glucose transporter GLUT1 gene expression and activity under stress: Role of PKC, CAM II kinase, and calcineurin. Am J Soc Nephrol 8: (Abstract)1834, 1997