

Cyclosporine A가 PDGF 및 IL-1 α 유발 메산지움 세포내 Cytosolic 및 Group-II Secretory Phospholipase A₂ 활동도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소

최규현 · 이승우 · 강신욱 · 이호영 · 한대석

〈요 약〉

Cyclosporine A(CsA)의 사구체 질환에 대한 치료 효과 및 신독성 유발 기전의 하나로 CsA에 의한 메산지움 세포의 cytosolic과 group-II secretory PLA₂(c, sPLA₂)에 의한 prostaglandin(PG) 생성 및 사구체내 염증 반응 매개에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 배양된 백서 메산지움 세포로부터 PDGF 및 IL-1 α 자극에 의한 c와 sPLA₂ 활동도(activity)에 CsA(100 ng/ml)의 투여가 미치는 영향을 실험하였다. PLA₂ 활동도는 세포질 분획과 배양 상청액으로부터 각각 [¹⁴C]arachidonylphosphatidyl choline(cPLA₂), ethanolamine(sPLA₂)을 substrate로 유리된 arachidonic acid(A.A.)양을 thin layer chromatography로 측정하였으며, PLA₂ 단백질 분자량의 변화를 gel filtration chromatography로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) PDGF(10ng/ml)의 10분간 투여는 대조군에 비하여 cPLA₂ 활동도를 유의있게 증가시켰으나(M \pm S.D, 22.5 \pm 8.4 pmol of A.A./min/mg of protein vs 50.1 \pm 11.7, p<0.05), sPLA₂ 활동도에는 영향을 미치지 않았다.

2) IL-1 α (10ng/ml)의 10분간 투여는 cPLA₂ 활동도를 증가시켰으며(22.5 \pm 8.4 vs 45.4 \pm 10.6, p<0.05), 24시간후 배양상청액내 sPLA₂ 활동도의 현저한 증가를 보였다(47.5 \pm 7.7 fmol of A.A./hour/mg of supernatant protein vs 200.8 \pm 24.3, p<0.05).

3) CsA의 투여는 cPLA₂ 활동도를 유의있게 억제하였으나(PDGF; 50.1 \pm 11.7 vs 20.3 \pm 12.8, IL-1 α : 45.5 \pm 10.6 vs 25.2 \pm 13.3, p<0.05), sPLA₂ 활동도의 유리에는 억제 효과를 관찰할 수 없었다(IL-1 α ; 200.8 \pm 24.3 vs 180.0 \pm 19.6, p>0.05).

4) CsA의 투여 24시간후 배양상청액내 lactic dehydrogenase 치는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(대조군; 61.4 \pm 9.8 IU/L vs 70.4 \pm 12.1, p>0.05).

5) PDGF와 IL-1 α 자극후 활성화되는 c, sPLA₂는 각각 분자량이 약 60, 15 kD 이었고, CsA 투여에 따른 분자량 크기의 변화는 관찰할 수 없었다.

이상의 결과로보아 CsA의 투여는 메산지움 세포로부터 cPLA₂ 단백질 크기의 변화없이 활성화의 억제를 통하여 PG 생성이 저하될것으로 추정되며, sPLA₂ 활동도에 의하여 매개될수있는 사구체 손상에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단되나, cPLA₂ 활동도 억제 기전과 sPLA₂에 의한 사구체 손상의 매개 가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

서 론

* 이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Cyclosporin A(CsA)는 이식 분야에선 이미 사용이 필수적이고 면역 억제제로서는 가장 활발히 연구되

고 있는 약제의 하나이다. 그 작용 기전으로 말초혈액 T 림프구 가운데 helper T 세포의 interleukin(IL)-2 생성을 억제함으로써 면역 억제 효과를 나타냄은 이미 알려져 있으며, 미세변화 신증후군과 일부 초점성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis)에서도 부분 또는 완전 관해를 보고한 경우가 있어 면역 억제 효과 이외에도 신증후군을 동반하는 사구체 신염의 치료제로서 관심의 대상이 되고 있을 뿐 아니라 steroid 제제의 장기간 투여에 따르는 합병증을 방지하는 데에도 큰 도움이 되고 있다^{1, 2)}.

이러한 현저한 임상효과에도 불구하고 부작용으로서 신독성이 투여에 제약이 되고 있다³⁾. CsA 신독성의 가장 특징적인 것은 신혈관의 수축으로서 특히 세동맥의 수축이 현저하고^{4, 5)}, 초기의 혈관 변화와 함께 세뇨관 상피 세포의 손상, 세뇨관 괴사 등이 동반되며 1 개월 이상 투여한 경우에는 사구체내 세동맥내의 혈전, 국소성 사구체 경화 및 간질의 섬유화, 세뇨관 위축 등이 관찰된다^{6, 7)}. CsA 신독성의 기전은 혈관의 과잉 수축보다는 이완 기전의 장애로 인정되고 있으며 이에 대한 기전으로 혈관 내피 세포로부터의 nitric oxide를 비롯한 혈관 확장인자의 저하⁸⁾, prostaglandin(PG) E₂를 비롯한 혈관 확장 PG 생성의 감소^{9, 10)}, 혈관 평활근 세포 및 메산지움 세포내 칼슘 유입의 증가로 인한 지속적인 수축¹¹⁾ 등이 제시된바 있으나 아직 논란의 여지가 있는 실정이다. 그러나 혈관 이완의 제한을 고려할때 혈관 확장 기능이 있으며 신혈류량의 자율 조절 기능에 있어서 중요한 매개 물질인 사구체내의 PG¹²⁾ 생성의 저하에 의한 CsA 신독성 초래 가능성이 높을것으로 추정된다.

사구체내의 PG 생성은 주로 메산지움 세포에 의하여 조절되며 세포내 arachidonic acid(A.A.)로부터 cyclooxygenase에 의하여 PG으로 전환된다¹³⁾. 세포내 A.A.는 lysosome내의 phospholipase A₂(이하 PLA₂로 약함)에 의하여 세포막 인지질 sn-2 위치로부터 유리되어 생성된다. PLA₂는 세포질형(cytosolic PLA₂; cPLA₂)과 분비형(secretory PLA₂; sPLA₂)으로 구분되고 있으며¹⁴⁾, 메산지움 세포에서 호르몬 및 성장 인자 등의 외부 자극에 의하여 활성화 되는 PLA₂는 분자량 110 kD의 cPLA₂이다¹⁴⁾. cPLA₂는 인산화(phosphorylation)에 의하여 활성화 되고 세포질내 칼슘 농도의 상승에 따라 세포막으로 부착되어

A.A.를 유리한다^{14, 15)}. 메산지움 세포의 cPLA₂활동도는 주로 platelet-derived growth factor(PDGF), epidermal growth factor(EGF)와 같은 성장 인자 자극에 의한 활성화가 알려져 있으며, arginine vasopressin(AVP)에 의한 활성화도 보고된 바 있다^{16, 17)}. Copeland와 Yatscoff¹⁸⁾는 CsA이 메산지움 세포로부터 PGI₂의 생성을 억제함을 관찰하였고, Bunke 등¹⁰⁾은 angiotensin II(Ang II) 자극에 의한 PGE₂, 6-keto-PGF_{1 α} 생성도 억제함을 보고한 바 있으며 그 기전으로 cyclooxygenase 활동도의 억제 가능성을 제시하였다. Kremer 등¹⁹⁾은 CsA투여후 세포내 칼슘 농도의 증가와 함께 CsA투여후 phospholipase C (PLC) 의존성 신호 전달계의 억제를 보고하여 PLC를 경유하는 세포내 신호 전달계를 갖는 성장인자 등에 의한 A.A. 유리에도 영향을 미칠것으로 추정되나, A.A. 유리에 직접적으로 관여하는 cPLA₂의 활동도에 CsA투여가 미치는 영향에 대해선 뚜렷이 밝혀져 있지 않다.

sPLA₂는 분자량이 14 kD이고 활성화를 위하여 mM 수준의 칼슘 농도를 요하며, sn-2위치에 선택도가 뚜렷한 cPLA₂와 달리 sn-2 이외의 위치에 결합된 A.A.도 유리시키는 specific activity가 보다 강력한 isoform이다^{15, 20)}. 백서 신장에서도 mitochondria 및 microsome의 막성 부분에서 일부 활동도가 관찰되었으며²¹⁾, 결체 조직은 물론 메산지움 세포로부터도 IL-1 등의 cytokine 자극으로 생성되고 세포외로 분비되어 세포막의 파괴 등 강력한 염증 반응의 매개 역할을 함이 알려진 바 있으나^{15, 22)}, 세포질내에서의 활성화 과정이나 기능에 대해선 잘 알려져 있지 않다. Pfeilschifter 등²⁰⁾은 IL-1 β 에 의하여 메산지움 세포로부터 group II sPLA₂가 생성, 분비됨을 보고하여, sPLA₂는 세포외로 분비되어 paracrine fashion으로 주위 조직의 손상과 면역 세포들의 침윤, 섬유화 등을 매개할것으로 추정되어 사구체 신염 및 사구체 기저막 손상의 하나의 요인이 될수 있을 것으로 생각된다. Gronich 등²²⁾은 IL-1 α 에 의하여 초기에는 cPLA₂의 활성화가 일어나며 24시간후 분비형 sPLA₂의 증가를 보고하여 분자량이 c, 및 sPLA₂ 상호간에도 연관성이 있을 것으로 추측된다.

이에 저자 등은 CsA의 신독성 및 사구체 질환에 미치는 영향의 일부를 규명하기 위하여, 강력한 분열

유발물질이며 사구체 신염을 매개하는 것으로 알려진 PDGF와 sPLA₂ 분비를 유발하는 대표적인 cytokine 인 IL-1 α 자극에 의한 c 및 sPLA₂ 활동도에 CsA의 투여가 미치는 영향을 실험하였으며, gel-filtration chromatography를 이용하여 CsA투여 전후 c 및 sPLA₂ 분자량 크기의 변화를 확인하여 CsA이 효소 자체에 직접적으로 미칠수 있는 영향을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대상 및 방법

1. 시 약

PDGF-BB는 Sigma chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였으며 IL-1 α 는 R&D systems (Minneapolis, MN, U.S.A.), CsA는 Sandoz KOREA Ltd(Seoul, KOREA)로부터 구입하였고, [¹⁴C]arachidonylphosphatidylcholine, [¹⁴C]arachidonylphosphatidylethanolamine은 New England Nuclear (Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. RPMI-1640, Fetal calf serum, ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA), Ethylene Glycol-bis(β -aminoethyl Ether) Tetraacetic acid(EGTA), phenylmethylsulfonyl chloride(PMSF), pepstatin, leupeptin, Dimethylsulfoxide(DMSO), A.A., ethylacetate, isooctane 등은 Sigma chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였고 Scintillation fluid는 Insta-gel(Packard Co. Meriden, CT USA)을 사용하였다.

2. 방 법

1) 백서 사구체 메산지움 세포의 분리 및 배양

메산지움 세포의 배양은 최 등²³⁾의 방법에 따라 시행하였으며, 체중 200-250g의 Sprague-Dawley 백서 6 - 8 마리를 단두하여 희생시킨후 적출한 신장을 0-4 $^{\circ}$ C, Laminar flow 하에서 장축을 따라 반으로 절개후 razor blade로 피질부분 만을 잘라내어 penicillin, streptomycin이 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 옮긴후 pore size 200, 150, 75 μ m mesh에 순서대로 통과 시킨다. 75 μ m mesh에 남은 사구체를 PBS에 재부유 시킨후 1,000 rpm에서 5분간 원침하여 가라앉은 사구체에 20% fetal bovine

serum, 5 μ g/ml human transferrin, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 pH 7.4인 RPMI-1640배양액을 넣고 35mm culture dish에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, humidified incubator에서 배양한다. 일차 분리후 약 4주경 L-valine이 D-valine으로 대체된 EMEM 배양액으로 배양하여 섬유아세포의 오염을 최소화 하면서 7-10일 간격으로 계대 배양하여 계대배양 5-20회까지의 세포를 사용하였다.

2) PDGF, IL-1 α , CsA의 투여 및 세포질 분획의 분리

PDGF는 1%bovine serum albumin(BSA) 함유 0.1N acetic acid로 희석하였고 최종 농도 10ng/ml로 사용하였고, IL-1 α 도 10ng/ml이 되도록 PBS로 희석하여 투여 하였으며, CsA는 1mg/ml의 농도로 1% DMSO에 희석하여 각 실험 조건에 따라 일정 농도로 10분에서 24 시간까지 투여하였다. CsA 투여에 대한 대조군은 DMSO만 투여하여 비교하였으며 세포 손상 여부를 확인하기 위하여 배양액내 Lactic dehydrogenase(LDH)를 LDH-L reagent(Daichi, Tokyo, Japan)를 사용하여 kinetic rate법으로 측정하여 투여 전과 비교하였다. 90% 이상의 confluency를 이룬 메산지움 세포를 실험 시작 24 시간전에 0.1% BSA를 함유한 FCS-free RPMI 배지로 교환한후 PDGF, IL-1 α , CsA의 각각 계획된 용량을 정해진 시간 동안 첨가한 1ml의 배양상청액(culture supernatant)을 채취하여 protease 억제제 pepstatin(20 μ M), leupeptin(20 μ M), PMSF(0.1mM), aprotinin(10,000U/ml)을 첨가한후 5,000xg로 원침하여 cell debris 제거후 -70 $^{\circ}$ C에 보관한다. 남은 세포층을 3ml의 4 $^{\circ}$ C homogenization buffer(50mM HEPES, 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, pH 7.5)로 5회 세척한 다음 다시 2ml의 같은 buffer를 참가하고 rubber policeman으로 세포를 긁어내어 동일한 protease 억제제를 첨가한후 dounce homogenizer로 25 회가량 stroke하여 세포를 파괴시켜 얻은 균등액을 1,000xg에서 5분간 원침하여 cell debris 등을 제거하고 200,000xg에서 1시간동안 초고속 원침하여 분리된 상층액을 세포질 분획으로 하였다.

3) cPLA₂ 활동도 측정

Gronich 등¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였으며, PLA₂

의 활동도는 각 sample을 bovine serum albumin을 이용한 Lowry 등²⁴⁾의 방법으로 Abbott Laboratories의 protein assay kit(Abbott Park, IL, U.S.A.) 사용하여 동일한 양의 단백 함량이 되도록 하고 반응 substrate로 [¹⁴C]arachidonylphosphatidylcholine (New England Nuclear Boston, MA)를 사용하며, 최종 농도 15 μ M(58.3mCi/mmol)이 되도록 2 μ l씩 eppendorf 관에 넣고 4 μ l의 HEPES, CaCl₂를 첨가하여 최종 칼슘농도가 5mM이 되도록한후 각 sample을 34 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 수조에서 30 분간 반응 시킨다. 배양후 40 μ l의 2% acetic acid, 100 μ g/ml A.A.이 함유된 ethanol로 반응을 중단시킨후 silica gel thin layer chromatography plate(LK6D, Whatman, Hillsboro OR, USA)에 50 μ l씩 옮겨 말린후 ethylacetate/isooctane/H₂O/acetic acid, 55 : 75 : 100 : 8의 organic phase에서 분리하여 iodine vapor로 A.A.위치를 확인하고 긁어 내어 0.5ml의 물과 3ml의 scintillation fluid를 첨가하여 β -counter로 방사능을 측정한다. 세포 추출물이 들어있지 않은 blank sample을 같이 측정하여 결과는 pmoles of A.A. released/min/mg of extract protein으로 표시하였다.

4) sPLA₂ 활동도 측정

최 등²³⁾ 및 Pfeilschifter 등²⁵⁾의 방법을 일부 수정하여 cPLA₂ 활동도 측정에서의와 같이 단백 농도를 측정하고 substrate로 [¹⁴C]arachidonylphosphatidylethanolamine(New England Nuclear Boston, MA)를 사용하며, 최종 농도 15 μ M이 되도록 4 μ l씩 eppendorf 관에 넣고 최종 칼슘농도가 5mM이 되도록 100mM Tris HCl CaCl₂(pH 8.5) 8 μ l를 첨가하고 배양 상청액을 68 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 수조에서 60 분간 반응 시켰다. Acetic acid(2%)와 A.A. standard 가 함유된 ethanol로 반응을 중지시킨후 cPLA₂와 같은 방법으로 유리된 A.A.를 분리하여 β - counter로 방사능을 측정하였다. sPLA₂ 활동도는 fmol of A.A. released/hour/mg of supernatant protein으로 표시하였다.

5) Gel filtration column 분획

PDGF 및 IL-1 α 로 자극한 메산지움 세포의 c, sPLA₂ 단백질 분자량과 CsA 투여가 c, sPLA₂ 단백질의 크기에 미치는 영향을 분석하기위하여 anion ex-

change column 통과후 최대 활동도를 보이는 분획에 대하여 Nakamura 등²¹⁾과 최 등²³⁾의 방법을 참고하여 FPLC 24-ml Superose 12 gel filtration column(Pharmacia LKB Biotechnology Inc, Piscataway, NJ USA)을 이용하여 실험하였다. Column을 4 $^{\circ}$ C buffer(50mM Hepes, 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 150mM NaCl, pH 7.5)로 equilibration한후 준비된 세포질 분획 또는 배양상청액을 500 μ l씩 주입하고 0.5ml/min의 flow rate으로 통과시켜 1ml씩의 분획을 얻은 다음 각 분획으로부터 c, 및 sPLA₂ 활동도를 측정하였다. 분자량의 표시물로 Blue dextran(2,000 KD), BSA(66 KD), ovalbumin(45 KD), potassium ferricyanide(1.35 KD)를 사용하였으며, 각 분획의 단백 농도는 280nm의 흡광도에서 측정하였다.

7) 통계학적 처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하며, ANOVA one-way analysis에서 Scheffe's F-test를 이용한 통계분석에서 p<0.05에 유의성을 두었다.

결 과

1. PDGF, IL-1 α 자극에 의한 cPLA₂ 활동도의 변화

cPLA₂ 활동도는 PDGF 자극후 10ng/ml 농도에서 PC substrate에 대하여 56.0 \pm 12.0pmol/min/mg of protein, PE에 대하여 50.1 \pm 13.3으로 대조군 27.5 \pm 7.0, 22.0 \pm 9.2에 비하여 유의있게 증가하였으며(p<0.05, Fig. 1), IL-1 α 자극은 10ng/ml의 농도에서 대조군 20.4 \pm 9.6(PC) pmol/min/mg of protein, 18.5 \pm 8.0(PE)에 비하여 52.5 \pm 13.7(PC, 55.0 \pm 14.6(PE)으로 유의한 증가를 보였다(p<0.05, Fig. 2). PDGF, IL-1 α 모두 용량 비례적인 증가는 보이지 않았으나 10ng/ml 이상에서는 현저히 cPLA₂ 활동도를 증가 시킴을 알수 있었으며 cPLA₂는 PC, PE 모두에 대하여 유사한 활동도를 보여 substrate에 따른 선택성은 관찰할수 없었다.

2. CsA가 PDGF, IL-1 α 자극에 의한 cPLA₂ 활동도에 미치는 영향

CsA는 PG 생성을 억제하는 농도로 보고된 100

ng/ml을 투여하여 PDGF(10ng/ml) 및 IL-1 α (10ng/ml) 자극으로 활성화된 cPLA₂ 활동도에 미치는 영향

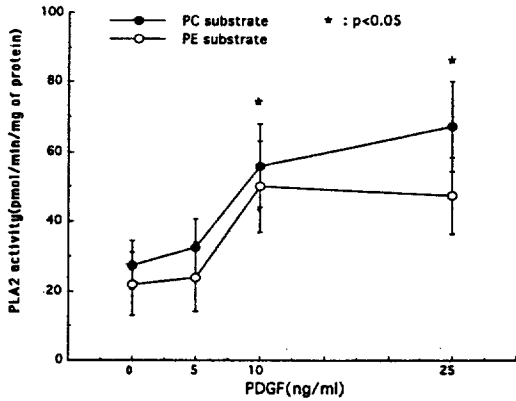


Fig. 1. Dose-response curve for stimulation of cPLA₂ activity by PDGF in rat mesangial cells. Data were presented as the mean value \pm S.D. of 4 experiments. * $p < 0.05$, compared to the value without PDGF.

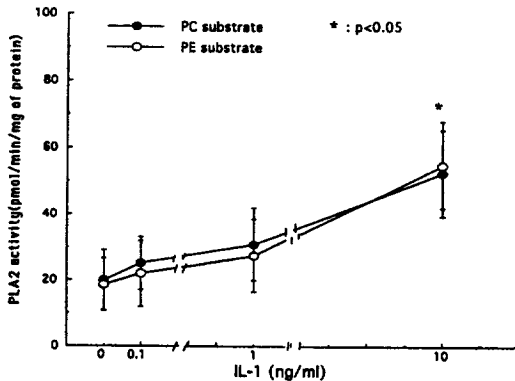


Fig. 2. Dose-response curve for stimulation of cPLA₂ activity by IL-1 α in rat mesangial cells. Data were presented as the mean value \pm S.D. of 4 experiments. * $p < 0.05$, compared to the value without IL-1 α .

을 실험한 결과 PDGF, IL-1 α 단독 투여군에 비하여 현저한 억제 효과를 보였다($p < 0.05$, Table 1). CsA의 cPLA₂ 활동도 억제효과는 PE를 이용한 측정에서도 유사한 결과를 보였으며 억제효과의 용량 비례관계를 조사하기 위한 실험에서 50ng/ml에서 부터 억제 효과를 보였다(Fig. 3).

3. PDGF, IL-1 α 및 CsA 투여후 cPLA₂ 활동도의 gel Filtration Chromatography 소견

PC substrate로 21 분획까지 얻어진 세포질 분획에 대하여 cPLA₂ 활동도를 측정된 결과 대조군의 활동도는 단일 최대치(peak)로 분자량 약 60 kD의 분획에서 얻을수 있었으며, PDGF 자극후 활동도 최대치는 분자량이 66 kD이상으로 대조군에 비하여 자극후 증가하는 소견을 나타내었다(Fig. 4). PDGF와 CsA를 같이 투여한 경우에 PDGF 투여시 증가한 활동도의 최대치는 현저히 감소하였으며 PDGF 투여시의 최대분획과 일치하였으나 대조군의 최대분획과는 차이를 보였다(Fig. 4).

IL-1 α 자극후 PE substrate로 측정된 cPLA₂ 활동도는 대조군에서는 PC substrate의 경우와 같이 60 kD에서 단일 최대치를 보였으나 IL-1 α 자극후에는 대조군에서의 최대치와 일치한 분획에서 현저한 활동도 증가와 함께 최대치를 보였으며, 분자량 14 kD 정도에서도 작은 peak을 관찰할수 있어 PDGF의 경우와 차이를 보였다(Fig. 5). IL-1 α 와 CsA를 같이 투여한 실험에서 cPLA₂ 활동도는 IL-1 α 투여시의 동일한 분획에서 대조군이하로 현저한 감소를 나타냈으며 14 kD의 peak에서는 뚜렷한 변화를 관찰할수 없었다(Fig. 5).

Table 1. The Effects of CsA on PDGF- and IL-1 α -stimulated cPLA₂ Activity in Mesangial Cells

	Control	PDGF	PDGF+CsA	IL-1 α	IL-1 α +CsA
PLA ₂ activity ¹					
PC	22.5 \pm 8.4	50.1 \pm 11.7*	20.3 \pm 12.8**	45.5 \pm 10.6*	25.2 \pm 13.3**
PE	18.2 \pm 7.0	41.2 \pm 13.8*	22.1 \pm 10.0**	42.2 \pm 12.4*	21.9 \pm 8.8**

Mean \pm S.D., N=3 in triplicate

PC : [¹⁴C]arachidonylphosphatidylcholine,

* : $p < 0.05$, vs control

PDGF, 10ng/ml, IL-1 α , 10ng/ml, CsA, 100ng/ml

1 : pmol/min/mg of protein

PE : [¹⁴C]arachidonylphosphatidylethanolamine

** : $P < 0.05$, vs PDGF or IL-1 α , alone

4. PDGF, IL-1 α 자극에 의한 sPLA₂ 활동도의 변화

PDGF(10ng/ml)투여 6, 12, 24 시간후 분리한 배양상청액으로부터 측정된 sPLA₂ 활동도는 PC, PE substrate 모두에 대하여 대조군에 비하여 뚜렷한 활동도를 관찰할수 없었다(24시간, PC; 47.4 \pm 10.2 fmol/hour/mg of protein, vs 42.0 \pm 9.9, PE; 45.7 \pm 11.0 vs 40.8 \pm 13.1, p>0.05). IL-1 α 자극에서는 PC substrate에 대한 활동도는 얻을수 없었으나 PE substrate로 측정된 결과 투여 6 시간부터 현저한 증가를 보였으며, 24 시간까지 지속적인 증가를 보였다(24시간, PE; 220.8 \pm 30.0 fmol/hour/mg of protein vs 52.7 \pm 12.4, p<0.05, Fig. 6).

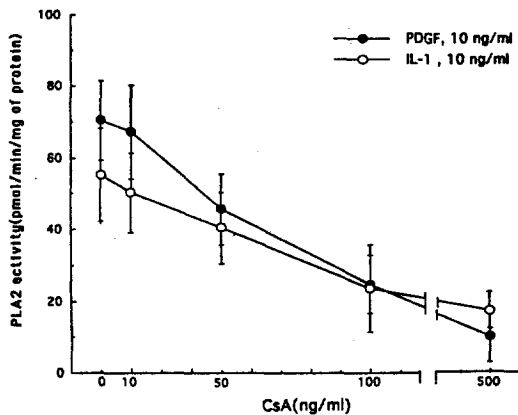


Fig. 3. Dose-response curve for inhibition of cPLA₂ activity by CsA. Data were presented as the mean value \pm S.D. of 2 experiments.

5. CsA가 IL-1 α 자극에 의한 sPLA₂ 활동도에 미치는 영향

CsA이 IL-1 α 자극에 의한 sPLA₂ 활동도에 미치는 영향에 대한 실험에서 CsA(100ng/ml)과 IL-1 α 를 같이 투여한 경우에 IL-1 α 단독 투여에 비하여 sPLA₂ 활동도의 유의있는 저하를 관찰할수 없었다 (Table 2). CsA 100ng/ml 농도에서 24시간 노출에 따른 메산지움 세포의 손상여부를 확인하기 위하여 측정된 LDH는 대조군과 유의한 상승을 보이지 않았다 (Table 2).

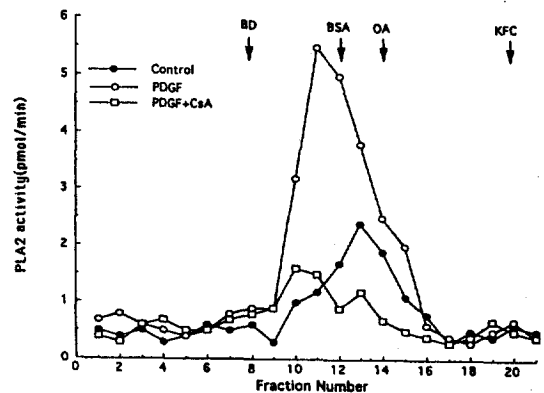


Fig. 4. FPLC Superose gel filtration chromatography of cytosolic extracts from mesangial cells treated with PDGF and CsA. The activity in PDGF(10ng/ml)-stimulated extracts was greater than control sample and the stimulation at the peak fraction was inhibited by CsA(100ng/ml). PLA₂ activity was assayed with PC, and column was calibrated with indicated standards: Blue dextran(6,000 kD), Bovine serum albumin(66 kD), Ovalbumin(43 kD), potassium ferricyanide(1.35 kD). Results shown were representative of two experiments.

Table 2. The Effects of CsA on sPLA₂ Activity of the Supernatant from Mesangial Cells Treated with PDGF and IL-1 α

	Control	PDGF	PDGF+CsA	IL-1 α	IL-1 α +CsA
PLA ₂ activity ¹					
PC	35.0 \pm 10.3	40.1 \pm 9.5	38.3 \pm 8.8	32.4 \pm 15.6	30.9 \pm 9.9
PE	47.5 \pm 7.7	39.6 \pm 13.3	49.1 \pm 12.8	200.8 \pm 24.3*	180.0 \pm 19.6*
LDH ²	61.4 \pm 9.8			73.5 \pm 9.9	70.4 \pm 12.1

Mean \pm S.D., N=3 in duplicate

PC : [¹⁴C]arachidonylphosphatidylcholine

* : p<0.05, vs control

CsA, 100ng/ml,

1 : fmol/hour/mg of protein, 2 : lactic dehydrogenase, IU/L

PE : [¹⁴C]arachidonylphosphatidylethanolamine

PDGF, 10ng/ml, IL-1 α , 10ng/ml, stimulation for 24 hours

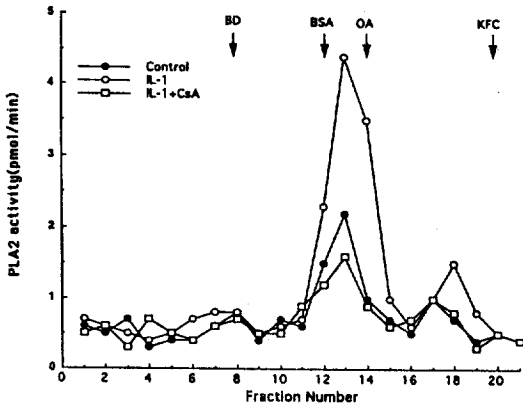


Fig. 5. FPLC Superose gel filtration chromatography of cytosolic extracts from mesangial cells treated with IL-1 α and CsA. The activity in IL-1 α (10ng/ml)-stimulated extracts was greater than control sample and the stimulation at the peak fraction was inhibited by CsA(100ng/ml). PLA₂ activity was assayed with PE, and molecular mass markers were the same as those in Fig. 4. Results shown were representative of two experiments.

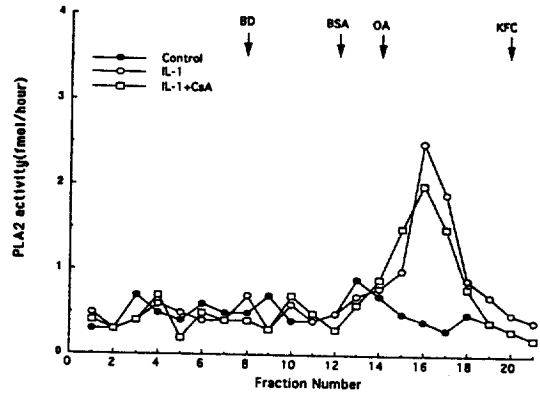


Fig. 7. FPLC Superose gel filtration chromatography of the supernatant from mesangial cells treated with IL-1 α and CsA. The activity in IL-1 α (10ng/ml)-stimulated supernatant was greater than control sample and the activity at the peak fraction was not inhibited by CsA(100ng/ml). sPLA₂ activity was assayed with PE, and molecular mass markers were the same as those in Fig. 4. Results shown were representative of two experiments.

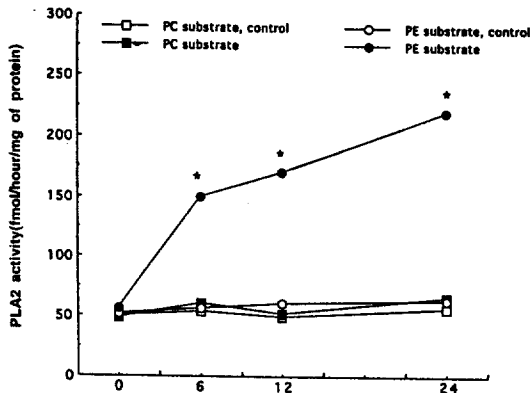


Fig. 6. sPLA₂ activity of the supernatant from mesangial cells stimulated by IL-1 α , according to the time of exposure. IL-1 α (10ng/ml) stimulated sPLA₂ activity in a time-dependent manner. sPLA₂ activity was assayed with PC or PE as substrate, in duplicate. sPLA₂ activity using PC as substrate was hardly detectable. Data were presented as the mean value of 3 experiments. * $p < 0.05$, compared to the value without IL-1 α .

6. IL-1 α , CsA 투여후 sPLA₂ 활동도의 Gel Filtration Chromatography 소견

IL-1 α 를 투여하지않은 대조군의 배양상청액을 gel

filtration column으로 분획하여 PE substrate로 측정된 sPLA₂ 활동도는 모든 분획에서 뚜렷한 활동도를 관찰할수 없었으나, IL-1 α (10ng/ml)에 24시간 노출된 배양 상청액은 분자량 약 15 kD 분획에서 단일 최대치를 보였다(Fig. 7). IL-1 α 와 CsA를 같이 투여한 실험에서 sPLA₂ 활동도는 IL-1 α 단독 투여시와 동일한 분획에서 최대치를 보였으며 활동도의 뚜렷한 감소를 보이지 않아(Fig. 7), CsA에 의한 억제 효과는 관찰할수 없었으며 분자량의 변화도 없는 것으로 사료되었다.

고 안

PLA₂는 PG생성의 주된 조절 효소로서 성장 인자 및 호르몬의 자극에 의하여 활성화되며, PKC를 비롯한 protein kinase에 의하여 인산화되고 세포내 칼슘에 의하여 세포막 phospholipid에 작용하여 A.A.를 유리하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 본 연구에서 매산지움 세포의 대표적인 성장인자인 PDGF와 cytokine인 IL-1 α 의 투여후 cPLA₂ 활동도의 현저한 증가를 관찰할수 있었다. PDGF는 세포내 칼슘의 증가와 PKC 활성화를 유발하므로 AVF, Ang II 등과 유사한 경로로 cPLA₂를 활성화 시킬것으로 추정된다¹⁶⁾. IL-1

은 세포내 신호전달계가 정확히 알려져 있지는 않으나 세포내 칼슘의 증가를 유발하지 않으며 간접적으로 PKC이외의 protein kinase 활동도를 활성화 시켜 인산화 과정을 거쳐 활동도를 증가시킬 것으로 사료된다^{22, 26}). Gronich 등²²)은 10ng/ml의 IL-1 α 로 30분 자극후 cPLA₂ 활동도의 증가를 보고하였으며 Schalkwijk 등²⁷)은 IL-1 β 로 24시간 자극으로 활동도의 증가를 보고하여 활성화 시간에는 차이를 보였다. Floege 등²⁸)은 PDGF, monokine 자극에 의한 메산지움 세포의 prostanoid 생성 증가를 보고한 바 있어 본 연구에서 cPLA₂ 활동도의 증가가 prostanoid 생성 증가 기전의 하나가 될수 있을 것으로 사료된다.

CsA는 fungal polypeptide로서 호지성(lipophilic) 특성을 가지고 있으므로 세포막의 통과가 용이하여 세포내 다양한 신호 전달계 및 조절기능에 영향을 미칠 수 있다^{5, 10}). 메산지움 세포에 미치는 영향으로는 DNA 합성을 제한하고²⁹), 교원질 합성을 증가시킴 등이 보고되어³⁰) 다양한 단백질 합성에도 영향을 미칠 것으로 사료되고, PG 생성 억제 등과 함께 CsA 신독성의 기전으로 제시되고있다. 또한 Walker 등³¹)은 세뇨관 상피세포에서 PKC 활성화의 억제를 보고하였으며, Martin 등³²)은 IL-1 α, β 자극에 의한 cyclooxygenase II의 억제를 보고하기도 하여 성장인자를 비롯하여 cytokine의 세포내 자극 전달경로에도 영향을 미칠것으로 추정된다.

본 연구에서는 CsA 농도 100ng/ml에서 PDGF, IL-1 α 자극에 의한 cPLA₂ 활동도를 의의있게 억제하였다. Kremer 등¹⁹)은 CsA 농도 1 μ g/ml에서 AVP 자극에 의한 PG 생성이 억제됨을 보고하였으며, AVP 자극후 ¹⁴C-A.A. 유리의 억제를 관찰하여 PLA₂ 억제에 의한 A.A. 유리 감소가 CsA투여시 혈관 확장성 PG 생성의 억제 기전의 하나로 제시하였으나 세포 손상에 대한 평가나 억제 효과의 최저 농도에 대해선 언급이 없었다. Martin 등³²)은 CsA 250ng/ml 이상의 농도에서 IL-1 α, β 자극에 의한 cyclooxygenase 발현의 억제를 보고한바 있어 PG 생성 저하는 PLA₂와 cyclooxygenase 두 효소 모두의 활동도 저하로 초래될 것으로 추정된다.

CsA의 메산지움 세포내 cPLA₂ 활동도 억제 기전으로 CsA 투여시 세포내 칼슘 유입의 증가와 AVP의 자극후 칼슘의 증가를 더욱 현저히 증가시킴을 고

려할때¹¹), 세포내 칼슘 의존성 protease의 활성화로 cPLA₂의 파괴를 추정할수 있다³³). 또한 CsA투여로 PKC activator인 1-oleoyl-2-acetylglycerol(OAG) 투여후 PGE₂ 생성의 억제¹⁰)는 PKC 경유 PG생성에 영향함을 나타내는 것으로 PKC가 PLA₂ 활성화의 주된 효소임을 고려할때 CsA투여로 PKC에 의한 PLA₂ 활성화가 억제되어 활동도의 저하가 초래될수 있을 것으로 사료된다. Schalkwijk 등³⁴)은 백서 메산지움 세포를 이용한 실험에서 IL-1 β 자극에 의한 cPLA₂ 활성화가 dexamethasone에 의하여 억제됨을 보고하였으며, cPLA₂ mRNA발현이 억제됨으로 보아 annexin을 비롯한 억제 단백질(inhibitory protein)에 의한 억제보다는 cPLA₂ 생성을 직접 제한하여 활동도를 저하 시킬것으로 주장하였다. 본 연구의 결과만으로 정확한 억제 기전을 제시할수는 없었으나, CsA 투여시 이상의 기전들이 단일 또는 복합적으로 작용하여 cPLA₂ 활동도를 저하시킬것으로 사료된다.

PDGF 및 IL-1 α 의 투여후 배양상청액내 sPLA₂ 활동도는 cPLA₂와 달리 PDGF 투여시 증가를 보이지 않았으며, IL-1 α 의 경우 6시간이후 24 시간까지 지속적인 증가를 보였다. 또한 sPLA₂는 PC에 대해선 활동도를 보이지 않은 반면 PE에 대해서만 활동도를 보여 substrate에 따른 선택성을 보였으며, Nakasato 등³⁵)과 유사한 결과를 얻었다. PDGF의 경우 Konieczkowski와 sedor¹⁵)도 sPLA₂ 활동도의 증가를 관찰할수 없었다고 보고한 바 있으며 이는 PDGF 투여는 sPLA₂ 활성화 경로에는 영향을 미치지 않음을 반영한다고 생각된다. 반면에 IL-1 α 의 투여에 의한 현저한 sPLA₂ 활동도의 증가는 시간 의존적으로 증가하며 배양상청액내 활동도 증가로 보아 sPLA₂가 생성되어 분비되는 것으로 추정된다. Schalkwijk 등²⁷)은 IL-1 β , adeny cyclase의 활성화 물질인 forskolin의 48 시간 투여로 배양 상청액내 sPLA₂ 활동도 증가를 관찰하였으며, Muhl 등³⁶)도 cAMP의 존성 경로를 통하여 sPLA₂가 생성되고 분비될것으로 추정하였다. 이상의 결과로보아 IL-1 α 자극으로 sPLA₂가 생성되어 세포외로 분비될 것으로 추정되나, 본 연구만으로는 단정할수 없었으며, 단백질 합성 저하의 투여 효과 또는 sPLA₂ mRNA 발현 등에 대한 추가 실험으로서 좀더 규명되어야 할것으로 사료된다.

sPLA₂ 활동도는 sPLA₂의 세포외 유리를 반영하

며 따라서 sPLA₂의 작용이 세포막 파괴를 비롯하여 염증 반응을 매개 할수 있음을 고려할때 부분적으로 사구체 신염의 사구체 손상 및 단백뇨의 기전의 하나가 될수 있을 것으로 추측된다. 또한 IL-1이 반월성 사구체 신염을 일부 매개함이 알려진바 있고³⁷⁾, Savin 등³⁸⁾은 심한 단백뇨를 동반한 초점성 분절성 사구체 경화증 환자의 혈청으로부터 분자량 약 50 kD의 순환성 인자를 보고한 바 있어, sPLA₂의 사구체 손상 매개 가능성을 추측할수 있으나, 본 연구는 백서를 대상으로 하였으며 분자량이 15 kD인점을 고려할때 연관성을 제시하기는 어렵다. 본 연구에서 측정된 sPLA₂의 활동도는 cPLA₂에 비하여 현저히 낮았으며 이들의 활동도는 칼슘농도 5mM에서 측정된것으로 일반적인 세포의 농도보다 높은 농도에서 얻은 결과이므로 실제 생체내에서의 칼슘농도인 약 1.5mM보다 월등히 높은 조건이므로 실제 유리된 sPLA₂에 의한 현저한 손상은 없을 것으로 생각된다. 그러나 메산지움 세포로부터 강력한 염증 반응 매개물질인 sPLA₂의 세포의 분비는 사구체 손상을 유발할수 있을것으로 추측되며 분리된 사구체를 분비형 sPLA₂에 노출시키는 실험등을 통하여 좀더 규명되어야 할 것으로 사료된다.

CsA 투여가 IL-1 α 자극에 의한 sPLA₂ 활동도에 미치는 영향에 대한 실험은 cPLA₂ 활동도를 억제한 100ng/ml의 농도에서 실험하였으나 sPLA₂ 활동도의 저하를 관찰할수 없었다. 이는 CsA이 IL-1 α 자극에 의한 sPLA₂ 활동도 증가 경로와 sPLA₂ 자체에는 현저한 영향을 미치지 않음을 반영하는 것으로 CsA의 PG 생성 억제 효과가 A.A. 유리의 감소에서 초래될수 있음을 고려할때 sPLA₂ 보다는 주로 cPLA₂의 활동도 억제가 주된 기전일 것으로 사료된다. Bonventre¹⁴⁾는 메산지움 세포의 mitochondria, microsome membrane내 sPLA₂가 존재함을 보고한 바있어, CsA에 의한 세포 손상 여부와 membrane 내 sPLA₂의 방출 여부를 간접적으로 확인하기 위하여 측정된 배양 상청액내 LDH치는 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않아 세포의 손상은 없었을 것으로 생각되고, 세포 손상에 의한 membrane sPLA₂의 방출은 없었을 것으로 판단된다. 100ng/ml 이상 농도의 CsA에 24 시간이상 노출시킬 경우 LDH를 이용한 세포 손상의 평가에서 LDH의 2배 이상 증가를 보

여 더 이상의 CsA 투여시 현저한 세포 손상이 예상되었으며, 24시간까지의 투여에서도 CsA 농도 200 ng/ml이상에서는 LDH의 상승을 관찰할수 있었다. CsA이 sPLA₂ 활동도에 영향을 미치지 않는 기전으로는 cPLA₂의 활성화 경로와 sPLA₂ 활성화 경로는 상호 독립적일 것으로 판단되며, sPLA₂ 자체가 CsA 작용에 저항성을 갖는 것으로 추정되나 향후 연구되어야 할 것으로 사료된다.

cPLA₂는 gel filtration column chromatography 상 분자량 60 kD 분획에서 단일 peak를 보여 Gronich 등¹⁶⁾과 Nakamura 등²¹⁾의 보고에서의 cPLA₂와 동일한 PLA₂로 생각된다. PDGF 자극후 cPLA₂ 활동도는 약 80 kD 분획에서 최대를 보여, cPLA₂ 활성화 과정에서 분자량의 증가를 반영하는 소견으로 보이나, 면역 블롯팅(immunoblotting) 등으로 좀더 규명되어야 할것으로 사료되며, 3 분획에서 활동도를 보이므로 PDGF 자극후 또 다른 크기의 PLA₂ 활동도를 갖는 단백질 존재를 배제할수 없었다. IL-1 α 투여후 활성화되는 cPLA₂는 대조군에서의 60 kD 분획과 동일한 분획에서 최대를 보여 메산지움 세포에서 phorbol ester, EGF 자극으로 활성화되는 것으로 보고된¹⁶⁾ cPLA₂와 동일한 cPLA₂임을 알 수 있었다. CsA투여후 PDGF 및 IL-1 α 자극으로 활성화된 cPLA₂ 활동도는 거의 모든 분획에서 뚜렷한 활동도를 발견할수 없을 정도로 억제되었으며, 저분자량으로의 활동도 변화는 관찰할수 없었다. Choi 등³³⁾은 신세뇨관의 저산소증 노출후 세뇨관 세포내 cPLA₂가 10 kD 정도의 저분자량으로 변화됨을 보고한 바 있어, CsA 투여후 세포내 칼슘 상승으로 초래될수 있는 protease 활동도 증가에 따른 PLA₂ 단백질의 파괴를 예상하였으나, CsA투여후 동일 최대치의 활동도 저하로 cPLA₂ 단백질의 분자량 변화는 없는 것으로 생각된다. 이상의 결과로 보아 CsA 투여에 따르는 cPLA₂ 활동도 저하는 분자량의 변화를 초래하는 효소 자체의 파괴보다는 cPLA₂의 변형(modification)에 의하여 초래될것으로 사료되며 annexin을 비롯한 억제 단백질에 미치는 영향 등에 대하여 좀더 규명되어야 할것으로 사료된다.

IL-1 α 으로 자극된 배양 상청액의 gel filtration chromatography 소견은 약 15 kD 분획에서 단일 최대치를 보여 Schalkwijk 등²⁷⁾과 Choi 등³³⁾의 보고

에서 동일한 분자량의 sPLA₂로 사료되며, IL-1 β 으로 실험한 Schalkwijk 등²⁷⁾의 보고로 보아 IL-1 α 와 β 는 동일한 sPLA₂를 활성화 하는것으로 사료된다. CsA 를 동시에 투여한 배양 상층액에서도 동일한 최대치를 보여 sPLA₂ 활동도에도 영향을 미치지 않을 뿐 아니라 sPLA₂ 분자량의 변화도 없으므로 IL-1 α 자극후 증가하는 sPLA₂ 활동도에 CsA는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 성장인자인 PDGF와 cytokine 인 IL-1 α 의 자극에 의하여 매산지움 세포의 cPLA₂가 활성화되고 IL-1 α 는 sPLA₂의 세포외 분비를 유발함으로써 A.A. 유리 및 PG생성을 초래할 것으로 판단되며 다양한 세포내외 기능에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 또한 CsA투여시 sPLA₂ 활동도는 영향을 받지 않는 반면에 PDGF, IL-1 α 자극으로 활성화되는 cPLA₂ 활동도를 저분자량으로의 파괴없이 억제하는 것으로 보아 CsA 신독성 기전의 하나로 추정되는 혈관 확장성 PG생성 저하는 cPLA₂ 활동도의 저하에 의하여 초래될것으로 사료된다. CsA 신독성의 추가 기전과 cPLA₂ 활동도 억제 기전을 규명하기 위하여 향후 cyclooxygenase 활동도의 측정 및 cPLA₂ 유전자 발현에 대한 연구와 함께 sPLA₂에 의한 사구체 손상의 매개 가능성에 대한 연구 등이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에 많은 도움을 주신 연세의대 생화학교실 박상욱 선생님, 연세대학교 원주의대 미생물학교실 김수기 선생님, 그리고 중앙연구실 김은희 기사에게 깊은 감사를 드립니다.

= Abstract =

The Effects of Cyclosporine on PDGF- and IL-1 α -Induced Cytosolic and Group II Secretory PLA₂ Activity in Cultured Rat Mesangial Cells

Kyu Hun Choi, M.D., Seung Woo Lee, M.D.
Shin Wook Kang, M.D., Ho Yung Lee, M.D.
and Dae Suk Han, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, the Institute of Kidney Disease
Yonsei University, Seoul, Korea*

The utility of Cyclosporine A(CsA) in various therapeutic applications is chiefly limited by considerable nephrotoxicity which seems to be related to its interference with the synthesis of vasoactive prostanoids. Mesangial cells have high levels of cytosolic PLA₂(cPLA₂), the regulatory enzyme in arachidonic acid(A.A.) release and prostaglandin(PG) synthesis, and group-II secretory PLA₂(sPLA₂), mediating inflammatory reaction. In order to investigate the molecular mechanism of the effect of CsA on PG synthesis, we evaluated the effect of CsA on the activity of PLA₂ stimulated by platelet-derived growth factor(PDGF) and interleukin-1 α (IL-1), which are known to play important roles in glomerular processes. The activity of PLA₂ was measured in cytosolic fraction and culture supernatant, and assayed by the release of free A.A. from exogenously added [¹⁴C]arachidonylphosphatidylcholine(cPLA₂) and ethanolamine(sPLA₂). Compared to control, PDGF(10ng/ml, 10min.) significantly stimulated cPLA₂ activity(M \pm S.D, 22.5 \pm 8.4 pmol of A.A./min/mg of protein vs 50.1 \pm 11.7, p<0.05), but did not increase sPLA₂ activity. IL-1(10ng/ml) treatment also significantly enhanced cPLA₂ activity(22.5 \pm 8.4 vs 45.4 \pm 10.6, p<0.05). IL-1 treatment for 24 hours significantly increased the release of sPLA₂ into the culture supernatant (47.5 \pm 7.7 fmol of A.A./hour/mg of supernatant protein vs 200.8 \pm 24.3, p<0.05). The administration of CsA(100ng/ml) markedly inhibited the activity of cPLA₂ following stimulation of PDGF or IL-1(PDGF; 50.1 \pm 11.7 vs 20.3 \pm 12.8, IL-1 α : 45.5 \pm 10.6 vs 25.2 \pm 13.3, p<0.05), but failed to prevent the increase of sPLA₂ activity(IL-1 α ; 200.8 \pm 24.3 vs IL-1 α +CsA; 180.0 \pm 19.6, p>0.05). There was no significant change of lactic dehydrogenase concentration in culture supernatant after exposure to cyclosporine for 24 hours(control; 61.4 \pm 9.8 IU/L vs IL-1 α +CsA; 70.4 \pm

12.1, $p > 0.05$). On gel filtration chromatography, PDGF- and IL-1 α -stimulated cPLA₂ activity migrated as a single peak, suggesting the molecular mass of approximately 60 kD, and the sPLA₂ activity was detected as a single peak with an estimated molecular mass of 15 kD. The administration of CsA did not change the position of peaks of both PLA₂ activity. These data suggest that while CsA does not influence the activity of sPLA₂, the inhibitory effect of CsA on cPLA₂ activity result from the modification of enzyme without change of molecular weight. We speculate that cPLA₂ in mesangial cells should be a molecular target for CsA providing a possible mechanism for interference of the drug with the balance of vasoactive prostanoids, but further studies on cyclooxygenase activity and PG measurement are needed.

Key Words : Cyclosporine, Mesangial cell, Phospholipase A₂, PDGF, IL-1 α

참 고 문 헌

- 1) Meyrier A: *Treatment of glomerular disease with cyclosporine A. Nephrol Dial Transplant* 4:923-931, 1989
- 2) 강종명, 김성권, 이호영, 이정상, 김명재: 성인 미세변화 신증후군에서의 Cyclosporine의 치료 효과. *대한신장학회잡지* 11:359-369, 1992
- 3) Myers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, Leutscher J, Whitney DJ, Krasny D, Cplon NS, Perlroth M: *The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. Kidney Int* 33:590-600, 1988
- 4) Myers BD: *Cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int* 36:964-974, 1986
- 5) Thompson SC, Tuicker BJ, Gabbai F, Blantz RC: *Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporin in male rats. J Clin Invest* 83:960-969, 1989
- 6) Skorecki KL, Rutledge WP, Schrier RW: *Acute cyclosporine nephrotoxicity-prototype for a renal membrane signalling disorder. Kidney Int* 42:1-10, 1992
- 7) Barros EJG, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schnor N: *Glomerular hemodynamics and hormonal participation in cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int* 32:19-25, 1987
- 8) Takenaka T, Hashimoto Y, Epstein M: *Diminished acetylcholine-induced vasodilatation in renal microvessels of cyclosporine-treated rats. J Am Soc Nephrol* 3:42-50, 1992
- 9) Neild GH, Racchi G, Imberti L, Fumagalli F, Brown Z, Remuzzi Z, Williams DG: *Effects of cyclosporine on prostacyclin synthesis by vascular tissue in rabbits. Transplant Proc* 15:2398-2400, 1983
- 10) Bunke M, Widler L, Martin A: *The effect of cyclosporine on agonist-stimulated glomerular and mesangial cell vasodilatory prostaglandin production. Transplantation* 52:718-722, 1991
- 11) Meyer-Lehnert H, Schrier RW: *Cyclosporin A enhances vasopressin-induced Ca²⁺ mobilization and contraction in mesangial cells. Kidney Int* 34:89-97, 1988
- 12) Scharschmidt LA, Lianos E, Dunn MJ: *Arachidonate metabolites and the control of glomerular function. Federation Proc* 42:3058-3063, 1983
- 13) Mene P, Simonson MS, Dunn MJ: *Eicosanoids, mesangial contraction, and intracellular signal transduction. Tohoku J exp Med* 166:57-73, 1992
- 14) Bonventre JV: *Phospholipase A₂ and signal transduction. J Am Soc Nephrol* 3:128-150, 1992
- 15) Konieczkowski M, Sedor JR: *Cell-specific regulation of type II phospholipase A₂ expression in rat mesangial cells. J Clin Invest* 92:2524-2532, 1993
- 16) Gronich JH, Bonventre JV, Nemenoff RA: *Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. J Biol Chem* 263:16645-16651, 1988
- 17) Bonventre JV, Weber PC, Gronich JH: *PAF and PDGF increase cytosolic [Ca²⁺] and phospholipase activity in mesangial cells. Am J Physiol* 254:F87-F94, 1988
- 18) Copeland KR, Yatscuff RW: *Comparison of the effects of cyclosporine and its metabolites on the release of prostacyclin and endothelin from mesangial cells. Transplantation* 53:640-645, 1992
- 19) Kremer S, Margolis B, Harpster P, Skorecki K: *Cyclosporine induced alterations in vasopressin signalling in the glomerular cell. Clin Invest Med* 12:201-206, 1989
- 20) Pfeilschifter J, Pignat W, Wosbeck K, Marki F, Wiesenberg J: *Susceptibility of Interleukin 1- and Tumor necrosis Factor-induced prostaglandin E₂ and phospholipase A₂ release from rat renal mesangial cells to different drugs. Bioch Soc Trans* 17:916-917, 1989
- 21) Nakamura H, Nemenoff RA, Gronich JH, Bonventre JV: *Subcellular characteristics of pho-*

- spholipase A₂ activity in the rat kidney. J Clin Invest 87:1810-1818, 1991*
- 22) Gronich J, Konieczkowski M, Gelb MH, Nemenoff RA, Sedor JR: *Interleukin 1 α causes rapid activation of cytosolic phospholipase A₂ by phosphorylation in rat mesangial cells. J Clin Invest 93:1224-1233, 1994*
 - 23) 최규현, Raphael A Nemenoff: 고농도의 당이 백서 사구체 메산지움 세포의 phospholipase A₂ 활동도에 미치는 영향. *대한신장학회지 12:523-532, 1993*
 - 24) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: *Protein measurements with Folin-phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275, 1951*
 - 25) Pfeilschifter J, Schalkwijk C, Briner VA, van den Bosch H: *Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A₂ by rat mesangial cells. J Clin invest 92:2516-2523, 1993*
 - 26) Sedor JR, Konieczkowski M, Huang S, Gronich JH, Nakazato Y, Gordon G, King CH: *Cytokines, mesangial cell activation and glomerular injury. Kidney Int 43(Suppl 39):s65-s70, 1993*
 - 27) Schalkwijk C, Pfeilschifter J, Marki F, Bosch Hvd: *Interleukin-1 β , tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun 174:268-275, 1991*
 - 28) Floege J, Topley N, Wessel K, Kaefer V, Radeke H, Hoppe J, Kishimoto T, Resch K: *Monokines and platelet-derived growth factor modulate prostanoid production in growth arrested, human mesangial cells. Kidney Int 37:859-869, 1990*
 - 29) Wann S, Fan CY, Huang TP: *The long-term effects of cyclosporine on cultured rat mesangial cell. Chinese Med J 49:34-40, 1992*
 - 30) Ghiggeri GM, Altieri P, Oleggini R, Valenti F, Ginevri F, Perfumo F, Gusmano R: *Cyclosporine enhances the synthesis of selected extracellular matrix proteins by renal cells "in culture". Transplant 57:1382-1388, 1994*
 - 31) Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ: *Cyclosporin A inhibits protein kinase C activity: A contributing mechanism in the development of nephrotoxicity? Biochem Biophys Res Commun 160:409-415, 1989*
 - 32) Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M: *Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporine A in rat mesangial cells. Kidney Int 45:150-158, 1994*
 - 33) KyuHun Choi, Edelstein CL, Gengaro P, Schrier RW, Nemenoff RA: *Hypoxia induces changes in phospholipase A₂ in rat proximal tubules: Evidence for multiple forms. Am J Physiol 269:F846-F853, 1995*
 - 34) Schalkwijk C, Vervoordeldonk M, Pfeilschifter J, Bosch Hvd: *Interleukin-1 β -induced cytosolic phospholipase A₂ activity and protein synthesis is blocked by dexamethasone in rat mesangial cells. FEBS Lett 333:339-343, 1993*
 - 35) Nakazato Y, Simonson MS, Herman WH, Konieczkowski M, Sedor JR: *Interleukin-1 α stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (Type II) phospholipase A₂. J Biol Chem 266:14119-14127, 1991*
 - 36) Muhl H, Geiger T, Pignat W, Marki F, Bosch Hvd, Vosbeck K, Pfeilschifter J: *PDGF suppresses the activation of group II phospholipase A₂ gene expression by interleukin 1 and forskolin in mesangial cells. FEBS lett 291:249-252, 1991*
 - 37) Atkins RC: *Interleukin-1 in crescentic glomerulonephritis. Kidney Int 48:576-586, 1995*
 - 38) Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F: *Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. N Engl J Med 334:878-883, 1996*