

신장의 허혈 재관류 손상에서 HMGB1의 역할과 Ethyl Pyruvate의 영향

¹이화여자대학교 의학전문대학원 외과학교실, ²연세대학교 의과대학 외과학교실

정구용¹ · 박재정¹ · 김유선²

The Role of HMGB1 and the Effect of Ethyl Pyruvate on Ischemia and Reperfusion Injury of Rat Kidney

Ku-Yong Chung, M.D.¹, Jae Jeong Park, M.D.¹ and Yu Seun Kim, M.D.²

¹Department of Surgery, Ewha Womans University School of Medicine, ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: High mobility group box-1 (HMGB1) was identified as a DNA binding protein that functions as a co-factor for proper transcriptional regulation in somatic cells. Extracellular HMGB1 acts as a potent pro-inflammatory cytokine that contributes to the pathogenesis of diverse inflammatory and infectious disorders. Ethyl pyruvate (EP), a stable aliphatic ester derived from pyruvic acid is the first described pharmacological inhibitor for HMGB1 secretion. We designed this study to identify the change of HMGB1 expression in rat kidney tissues of ischemia reperfusion injury and the effect of EP on the expression of HMGB1. **Methods:** Sprague-Dawley rats (200~300 g) were subjected to 40 minutes of renal warm ischemia. The animals were divided into three groups: sham group without warm ischemia, the EP group (EP given before ischemia), and the ischemic control group. Kidneys were harvested and serum creatinine, IL-1 and IL-6 were measured at 6hours, 1 day, 3 days and 5 days after reperfusion. Immunohistochemical stain of HMGB-1 was done. **Results:** Serum creatinine and IL-1 level were elevated in ischemic control group and EP injection group. In EP injection group, serum creatinine and IL-1 level were lower than the ischemic control group. In the rat 40

minutes ischemia reperfusion model, HMGB1 expression was increased at 6 hours after reperfusion. which was decreased gradually at 1 day, 3 days, and 5 days after reperfusion. HMGB1 expression was more distinct at outer medullary area. intraperitoneal EP injection has no effect on the expression of HMGB1. **Conclusion:** From these results, we deduced a conclusion that the preventive effect of EP on the rat kidney ischemia reperfusion injury is not by the decreased expression of HMGB1 but by the prevention of the release of the HMGB1. (J Korean Soc Transplant 2007;21:234-240)

Key Words: Ischemia Reperfusion Injury, HMGB1, Rat kidney

중심 단어: 허혈 재관류 손상, HMGB1, 쥐 신장

서 론

허혈 재관류 손상은 조직의 저산소 손상 후에 혈류와 산소운반이 재개되면서 악화되는 병태생리의 과정으로 이러한 손상의 임상적 중요성은 고형장기 이식, 다발성 손상, 저혈성 쇼크 그리고 간절제 등의 과정에서 더욱 크게 인식되어지고 있다.(1) 재관류 손상의 기전은 활성산소종(reactive oxygen species (ROS)), 염증성 싸이토카인(inflammatory cytokine) 등에 의한 직접적 물리적인 손상에서 시작하여 이러한 손상에 의해 촉발 되는 비특이적인 그리고 특이적인 면역반응에 의해 심화된다.(2) 이러한 면역반응의 연결고리에 pathogen associated molecular pattern (PAMP) 혹은 damage associated molecular pattern (DAMP)을 인식하는 ligand인 Toll like receptor (TLR)가 있다.(3) TLR를 자극하는 조직손상과 연관된 내인성 인자인 DAMP에는 heat shock protein (HSP)과 High-mobility group box 1 (HMGB1)이 있다.(4) High-mobility group box 1 (HMGB1)은 모든 포유동물 조직 세포에 광범위하게 분포하는 nonhistone chromatin 관련 단백질로 216개의 아미노산으로 구성되어 있으며 설치류와 인간 사이에 아미노산 염기 서열 일치율이 98%에 이를 정도로 중간 차이가 거의 없다.(5) HMGB1은 염증반응의 대표적 조기 싸이토카인인 tumor necrosis factor alpha (TNF-

책임저자 : 정구용, 서울시 양천구 목6동 911-1
이화여자대학교 의학전문대학원 외과학교실, 158-710
Tel: 02-2650-5020, Fax: 02-2644-7984
E-mail: kuyong@ewha.ac.kr

본 논문은 2006년도 대한이식학회 연구비 지원에 의해 수행된 논문임.

본 논문은 2007년도 대한이식학회 추계학술대회에서 발표하였음.

α)나 Interleukin-1 (IL-1)에 비해 패혈증의 후기과정에 관여하는 염증매개체로 알려져 있다.(6,7) HMGB1은 세균 내독소에 노출되었을 때 대식구나 단핵구에서 능동적으로 분비되어 TNF- α 등의 사이토카인 분비를 촉발한다.(8) 쥐 패혈증 모델에서 HMGB1은 복막염 유발 18시간 후에 체내에서 유의하게 증가하는 것으로 보고되며 따라서 HMGB1을 목표로 한 치료는 치료시간대를 확장시킬 수 있다는 점에서 그 효용성이 크다고 할 수 있다.(7) 내독소에 의한 능동적 분비 외에도 HMGB1은 세포의 손상에 의해서 수동적으로 누출되며 이렇게 누출된 HMGB1이 TLR와 반응하고 TLR는 세포내 신호전달 물질인 MyD88에 의한 신호전달 과정을 거쳐 NF- κ B를 활성화하여 염증성 사이토카인 분비를 촉발한다.(9) HMGB1의 능동적 분비를 억제하는 물질로 Ethyl Pyruvate (EP), Acetylcholine, Nicotine, Stearoyl Lysophosphatidylcholine 등이 알려져 있다.(10-12)

본 연구진은 쥐의 신장 허혈 재관류 손상 모델을 이용한 실험에서 EP의 투여에 의해 신장의 허혈 재관류 손상에 예방됨을 보고 하였다.(13) 이러한 효과는 HMGB1의 발현 변화 및 TNF- α 분비의 억제와 연관된 것으로 판단되었다.

이번 연구는 첫째, 쥐의 허혈 재관류 손상에서 HMGB1의 역할이 어떤 것인가 알고자 하였다. 즉 허혈 재관류 손상에 의해 HMGB1의 발현이 어떻게 변하며 쥐의 신장조직 중에서 특히 발현에 변화가 오는 부위가 있는지 알고자 하였다. 둘째로는 EP의 투여에 의한 효과가 전반적인 신장조직에서의 HMGB1의 발현 억제에 의한 것인지 아니면 HMGB1의 발현에는 변화가 없이 능동적 분비 억제에 의한 것인지 구별하기 위해, EP의 투여에 따르는 HMGB1의 발현 변화를 면역조직화학 염색을 통하여 보고자 하였다.

방 법

1) 신장 허혈 재관류 손상

Sprague Dawly rat (200~300 g)을 ketamin 복강내 주사로 마취 후 수술 테이블에 고정 하고 정중절개로 양측 신장을 노출하였다. 노출된 양측 신장의 신동맥과 신정맥을 혈관 겸자로 잡아서 혈류를 막고 40분간 허혈을 유도한 후 재관

류 하였다.

2) 각 군별 실험 방법

Sprague-Dawly rat 20마리를 삼수술군(n=4), EP 투여군(n=8), 그리고 허혈대조군(n=8)으로 나누어 실험하였으며, 삼수술군은 정중절개를 시행하여 소장 및 대장을 한번 복강 밖으로 노출시켰다가 폐복 하였다. EP는 Ringer's ethyl pyruvate solution (REPS)의 상태로 이화여자대학교 뇌신경과학교실로부터 취득하였다. EP 투여군은 허혈전 20분에 REPS를 rat의 kg당 EP 100 mg의 용량으로 복강내 투여하고 재관류 직후에도 같은 용량을 투여하였다. 허혈대조군은 허혈전 20분에 Ringer's lactated solution 1cc를 투여하고 재관류 직후에도 1 cc를 투여하였다. 각 군별로 각각 2마리씩 6시간째, 1일째, 3일째, 그리고 5일째 ketamine을 복강내 투여하여 마취시킨 후 복부를 정중절개하여 신장조직을 채취하고, 대동맥으로부터 혈액을 충분히 확보하고 난 다음 희생하였다(Fig. 1).

3) Serum creatinine, IL-1 및 IL-6 농도 측정

각 군에서 수술 후 날짜별로 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 채취하였으며, 분리된 혈청으로부터 혈청 크레아티닌을 측정하였다(Vitros®, Johnson & Johnson, USA). 또한 ELISA (Enzyme Linked Immuno-Solbent Assay) (Bender MedSystem, Austria, Europe)을 이용하여 IL-1, IL-6의 혈중농도를 정량적으로 측정하였다. 구체적인 실험방법은 ELISA plate 제조사에서 제공한 실험방법을 따랐으며, 대략적인 절차는 아래와 같다. 50 μ L의 standard diluent buffer를 zero well에 넣고, 50 μ L의 농도 별 표준용액과 시료용액을 각 well에 넣은 다음 anti-IL-1, anti-IL-6 (BioSource International, Inc., US) 용액 50 μ L를 각 well에 넣어 혼합하고 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 상층액을 제거한 후 수세 buffer로 3회 세척하였다. 그 후 streptavidin-HRP working solution 100 μ L를 각 well에 넣고 45분간 상온에서 반응시켰다. 수세 buffer로 다시 3회 세척하고, 100 μ L의 발색제를 각 well에 넣은 후 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 최종적으로 100 μ L의 stop solution을 각 well에 넣고, microplate reader기

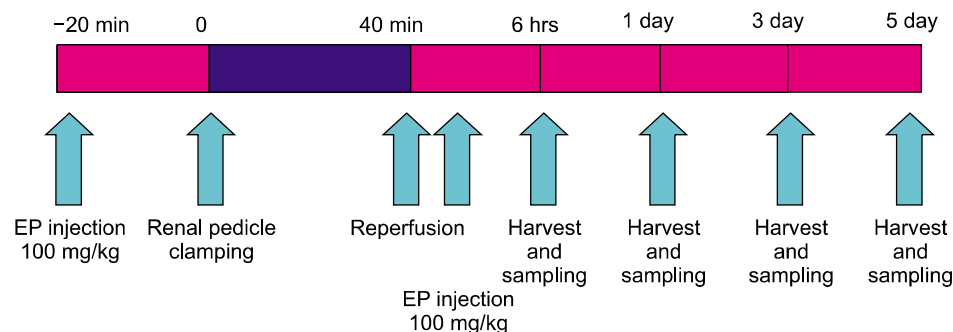


Fig. 1. Ischemia reperfusion injury, harvest and sampling.

Table 1. Serum creatinine level, 40 minutes ischemia and reperfusion

	Time after reperfusion			
	6 hr	1 day	3 days	5 days
EP group (n=2)	0.9	2.5	2.5	2.9
Control group (n=2)	0.95	2.65	3.5	4.1
Sham group (n=1)	0.3	0.7	0.8	0.3

EP group = EP injection group; Control group = Ischemic control group; Sham group = Sham operation group; Unit = mg/dL.

Table 2. Serum IL-1 level, 40 minutes ischemia and reperfusion

	Time after reperfusion			
	6 hr	1 day	3 days	5 days
EP group (n=2)	0.005	1.62	3.65	0.015
Control group (n=2)	2.23	2.065	3.255	4.05
Sham group (n=1)	1.62	1.62	1.62	1.22

EP group = EP injection group; Control group = Ischemic control group; Sham group = Sham operation group; Unit = mg/dL.

에서(450 nm) 발색도를 측정하여 정량화 하였다.

4) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위하여 파라핀에 포매된 조직을 약 4 μm의 두께로 잘라서 유리 슬라이드에 부착하여 충분히 건조시켰다. 조직을 xylene 용액에 2회 처리후 100%, 95%, 80%, 70% 알코올을 단계적으로 이용하여 파라핀을 제거하고 증류수와, 인산염 식염수(phosphate buffered saline)로 세척하였다. 이후 3% 과산화수소수로 처리하여 내인성 peroxidase를 차단하였다. 항원성 회복을 위하여 trypsin용액을 이용 15분간 반응시켰다.

Table 3. Serum IL6 level, 40 minutes ischemia and reperfusion

	Time after reperfusion			
	6 hr	1 day	3 days	5 days
EP group (n=2)	0	0	0	0
Control group (n=2)	0	211.6	2.4	64.3
Sham group (n=1)	0.4	0	0	0

EP group = EP injection group; Control group = Ischemic control group; Sham group = Sham operation group; Unit = mg/dL.

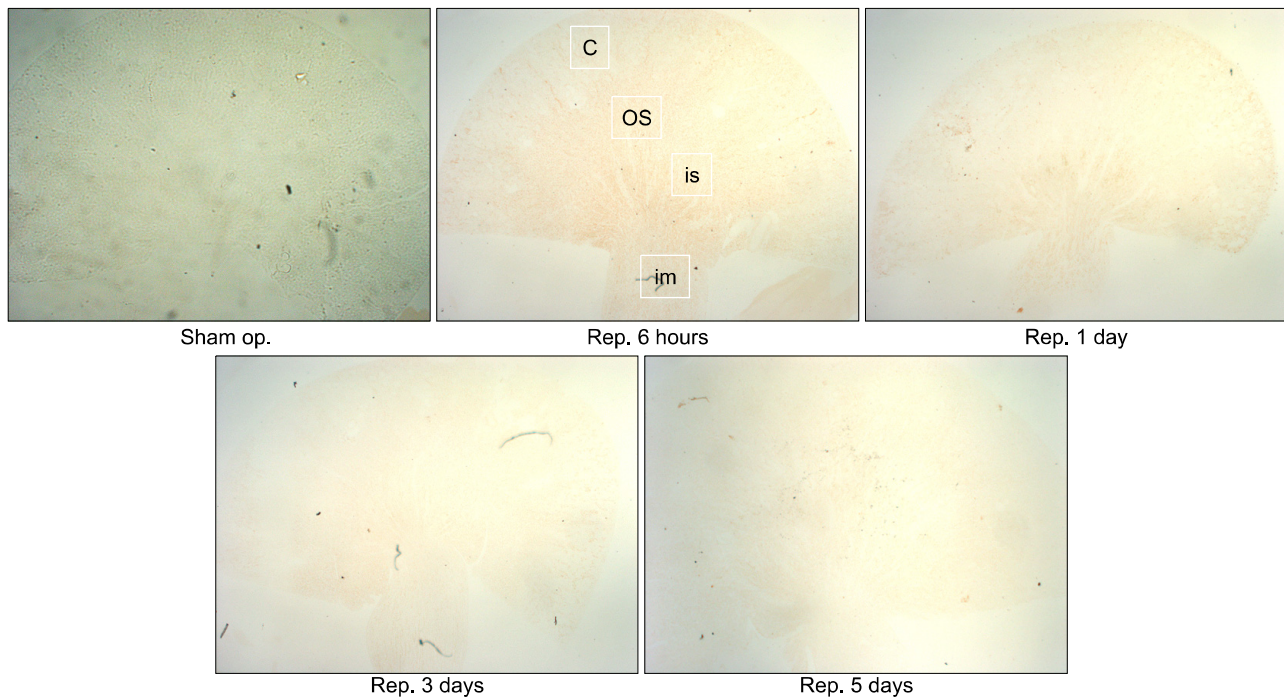


Fig. 2. Immunohistochemical stain in sham operation and ischemic control rat kidney (×12.5) Increased HMGB1 expression at reperfusion 6 hours, HMGB1 expression is gradually diminished at reperfusion 1 day, 3 days, and 5 days (1:1000 antiHMGB1 antibody, Sham op. = Sham operation, Rep. 6 hours, 1 day, 3 days, 5 days = reperfusion 6 hours, 1 day, 3 days, and 5 days each) (c = cortex, os = outer strip of outer medulla, is = inner strip of outer medulla, im = inner medulla).

일차 항체로 1:1000으로 희석한 HMGB1항체(Novus biologicals, Littleton, CO, USA)를 사용하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. 인산염 식염수로 5분간 2회 세척하고 1:100으로 희석한 이차 항체(donky anti-rabbit poly-clonal antibody)를 실온에서 1시간 반응시키고 인산염 식염수로 세척 후 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride로 발색한 후 대조 염

색을 시행하지 않고 슬라이드를 완성하였다

5) 각 군사이의 비교

혈청 크레아티닌과 혈청 TNF- α 에 대한 본 연구진의 결과(13)가 있으므로 이를 인용하였고 본 논문의 실험에서는 개체수가 적어서 통계검정은 하지 않았다. 조직 염색결과

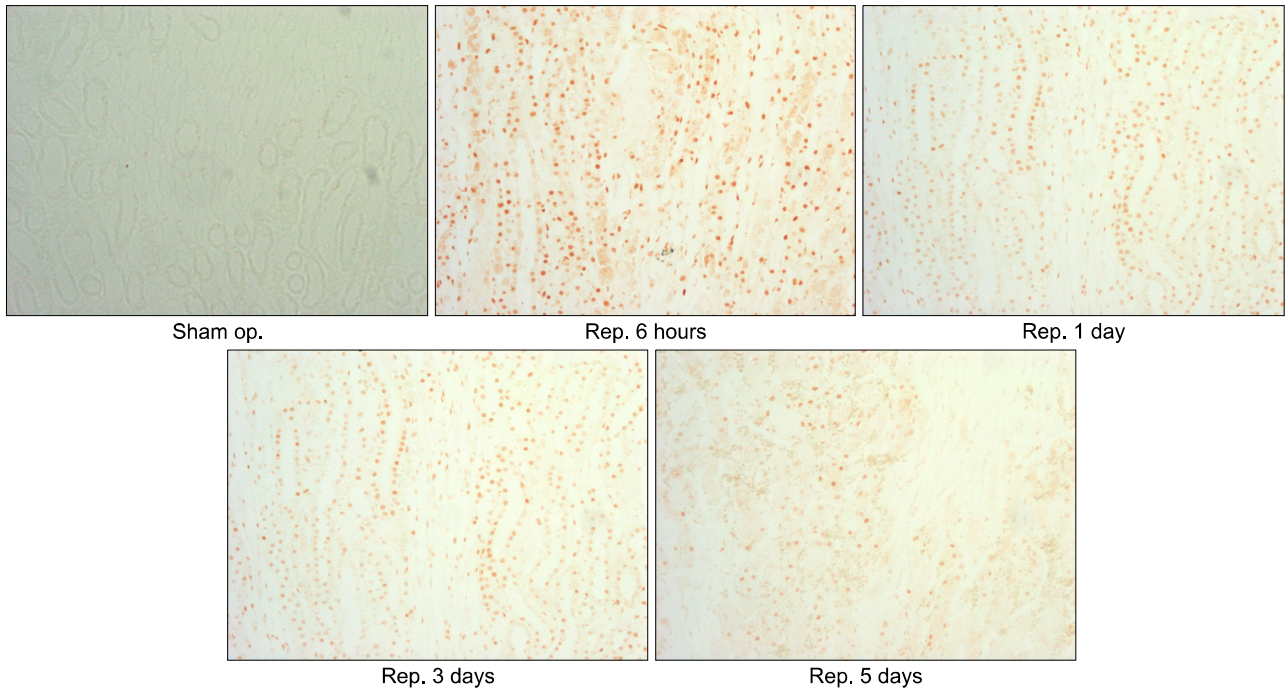


Fig. 3. Immunohistochemical stain in sham operation and ischemic control rat kidney (outer medulla $\times 200$) (1:1,000 antiHMGB1 antibody, Sham op. = Sham operation, Rep. 6 hours, 1 day, 3 days, 5 days = reperfusion 6 hours, 1 day, 3 days, and 5 days each).

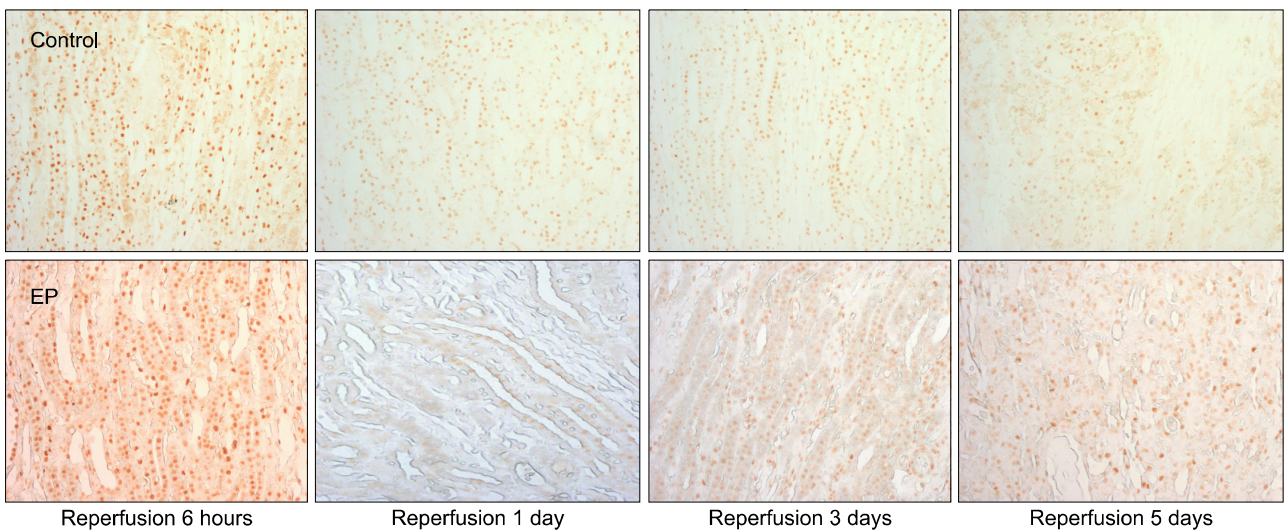


Fig. 4. Compare of HMGB1 expression between ischemic control group and EP injection group at reperfusion 6 hours, 1 day, 3 days, and 5 days (control=control group, EP = Ep injection group) (1:1,000, outer medulla $\times 200$).

는 표식이 안 된 조직 슬라이드에서 육안으로 핵과 세포질의 염색 정도를 0 (전혀 염색이 안 되는 경우), 1 (핵에서만 약하게 염색이 되는 경우), 2 (핵과 세포질에서 약하게 염색이 되는 경우), 3 (핵과 세포질에서 강하게 염색이 되는 경우), 등으로 등급을 나누어서 관찰하고 두장의 슬라이드의 점수를 합산하여 비교하였다.

결 과

1) Serum creatine, IL-1, IL-6 측정

혈청 크레아티닌은 재관류 1일째부터 증가하기 시작하여 3일째와 5일째 계속 높은 수치를 보였다. EP 투여군과 대조군 모두 삼수술군에 비해 높은 크레아티닌 수치를 보여 허혈 재관류 손상이 확실하게 된 것이 확인 되었다(Table 1). 혈청 IL-1과 IL-6는 모두 EP 투여군에서 대조군에 비해 낮은 수치를 보였으나(Table 2, 3), 혈청 IL-6의 경우는 개체간 수치의 차이가 심해서 좀 더 많은 개체수로 보정해야 할 필요가 있었다.

2) 면역조직화학 염색

허혈 재관류 손상을 받은 쥐의 신장조직에서 재관류 6시간 후에 HMGB1의 발현이 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 HMGB1의 조직 발현은 1일째, 3일째, 5일째로 시간이 경과 할수록 발현이 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 2, 3). HMGB1 발현의 증가는 신장의 outer medulla부위에서 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2, 3), HMGB1의 발현을 허혈 대조군과 EP 투여군 사이에서 비교 하였을 때 재관류 6시간째에 EP 투여군에서 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었으나 재관류 1일, 3일, 5일째에는 큰 차이가 없었다(Fig. 4).

고 찰

신장이식 수술과정에서 겪게 되는 허혈 재관류 손상은 이식 후 급성 세뇨관 괴사와 이에 따른 급성 신기능 부전을 초래할 뿐만 아니라, 만성적인 이식신 기능부전을 초래하는 중요한 요인이 된다.(14) 허혈 재관류 손상은 신장이식 수술이외에도 복부 대동맥류 수술 등 신장으로의 혈류가 감소하는 모든 수술 혹은 외상의 경우에도 같은 병태생리의 과정으로 신기능 부전을 초래한다.(15,16) 뿐만 아니라 심장, 폐, 간장, 뇌 등 여러 장기의 순환장애 상황에서도 역시 허혈 재관류 손상이 장기 기능 부전으로 진행되는 과정에 핵심을 차지하고 있다. 허혈 재관류 손상은 허혈시의 조직손상 보다 재관류 시에 조직 손상이 훨씬 더 심하게 받게 되는데, 이러한 사실로 인해 재관류라고 하는 임상적 치료 개시 시점에서 그 조직 손상을 예방하는 방법을 강구 할 수 있다는 시간적 적절성이 허혈 재관류 손상의 예방에 대한 가치와 의미를 크게 만들고 있다.

허혈 재관류 손상의 병태 생리에 대해서는 지금까지 수많은 연구가 진행되어 왔는데 크게 보았을 때 활성 산소족, 염증성 사이토카인 등에 의한 물리적 손상과 이에 이어진 비특이적 혹은 특이적 면역반응에 의한 염증반응이 한 축이고 이러한 공격적 인자에 대한 자연적인 방어기전인 항산화효소, Hemeoxygenase-1 등이 또 다른 한축으로 연구되고 있다.(17) 본 연구에서는 허혈 재관류 손상에 의한 물리적 조직 손상이 특이적 면역반응을 촉발시키는 과정에서 HMGB1이 하는 역할을 규명해 보고자 하였다.

질병상태 조직에서의 HMGB1의 발현상태 변화에 대해서는 아직 보고된 연구결과가 많지 않은데, Zhang 등(18)은 쥐의 패혈증 모델의 폐, 신장, 간, 소장 조직에서 HMGB1의 m-RNA가 증가한다고 보고하였다. Akaike 등(19)은 intestinal type의 위암세포조직에서 diffuse type의 위암세포조직보다 HMGB1의 발현이 증가한다고 하였고, Popovic 등(20)은 Lupus erythematosus 환자의 피부조직에서 HMGB1의 발현이 증가한다고 하였다. Ulfgren 등(21)은 polymyositis 와 dermatomyositis 환자에서 증가된 HMGB1의 발현이 대용량의 스테로이드 투여에 의해 감소된다고 하였다.

본 연구에서는 신장의 허혈 재관류 손상에서 HMGB1의 발현 변화를 면역조직화학 염색으로 규명해 보고자 하였는데, 1:1000 보다 고농도의 항체 농도에서는 거의 모든 세포에서 염색이 되어 차이를 확인 할 수 없었으나, 1:1000 농도의 항체 농도에서 정상 대조군에 비해 허혈 재관류군의 신장에서 발현에 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. HMGB1의 조직 염색은 medulla 부위 특히 outer medulla 부위에서 발현이 증가하는 것으로 보였는데 이는 신장의 허혈 재관류 손상이 특히 proximal tubule에서 뚜렷하게 관찰됨을 생각할 때 이와 연관된 변화로 생각된다. HMGB1 발현의 증가는 재관류 6시간부터 관찰 되었으며 재관류 1일, 3일, 5일로 시간이 경과되면서 감소되는 것을 확인하였다. Yang과 Ochani (7)는 쥐의 복막염에 의한 패혈증 모델에서 손상 18시간부터 혈청내 HMGB1이 증가한다고 보고하였는데, 조직에서의 발현 증가는 혈청내 증가보다 일찍 나타나는 것으로 판단된다.

EP는 pyruvate와 ethanol로부터 합성되었으며,(22) Ringer's ethyl pyruvate solution (REPS)의 형태에서 EP와 칼슘 및 포타슘 이온이 결합함으로써 안정성을 유지시킬 수 있다.(23) Tsung 등(24)은 간의 허혈 재관류 손상 모델에서 EP와 lactated Ringer's solution을 정맥 주사하여 EP 투여군에서 혈청 transaminase 및 간괴사 정도, 중성구 침윤이 의미 있게 감소함을 보고하였다. 이는 사이토카인 분비에 관여하는 NF- κ B 활성이 억제되어 염증성 사이토카인이 감소함으로써 생기는 결과라고 하였다. Uchiyama 등(25)은, 생쥐의 소장 장관막 허혈 재관류 손상시 회장 점막의 hydrophilic macromolecule 및 fluorescein isothiocyanate dextran (molecular mass 4,000 Da)에 대한 투과율이 현저히 증가하는데,

낮은 농도(17 mg/kg)의 EP를 투여한 경우는 장점막 투과율에 변화가 없었으나, 높은 농도(50 and 150 mg/kg)의 EP를 투여한 경우에는 허혈 재관류 손상에 의한 장투과성이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. Ulloa 등(26)은 쥐의 폐혈증 모델에서 EP의 투여가 치사율을 호전시키는데 이러한 EP의 효과는 HMGB1의 분비를 억제함으로써 나타난다고 하였다.

신장의 허혈 재관류 손상에서 나타나는 EP의 효과가 HMGB1의 발현억제에 의한 것인지 혹은 HMGB1의 분비억제와 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 EP 투여군과 허혈 대조군의 HMGB1의 발현 양상을 비교한 결과에서 재관류 1일째, 3일째, 5일째에 양군에 큰 차이를 확인할 수 없었으며 오히려 재관류 6시간째의 EP투여군에서는 HMGB1의 발현이 증가되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 EP의 투여에 의해 HMGB1의 능동적 분비가 억제되어 세포내에 축적되어 있음으로써 오히려 염색이 증가되는 것으로 판단되며 따라서 EP의 투여에 의한 허혈 재관류 예방효과는 HMGB1의 발현에 영향을 주어서 라기 보다는 이미 손상된 조직 혹은 대식구/단핵구에서 HMGB1의 분비를 감소시킴으로써 나타나는 현상일 것으로 추정된다.

결 론

쥐의 신장 허혈 재관류 손상에서 HMGB1의 발현이 재관류 6시간에 특히 Outer Medulla 부위에서 증가되는 것이 관찰 되었으며, 이러한 발현의 증가는 재관류 1일, 3일, 5일째 시간이 경과하면서 점차 감소하였다. 신장의 허혈 재관류 손상에서 나타나는 EP의 효과가 HMGB1의 발현억제에 의한 것인지 혹은 HMGB1의 분비억제와 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 EP 투여군과 허혈 대조군의 HMGB1의 발현 양상을 비교한 결과 재관류 6시간째의 EP투여군에서 HMGB1의 발현이 허혈 대조군에 비해 증가되었다가 이후 재관류 1일째, 3일째, 5일째에서는 양군에서 차이가 사라지는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 EP의 투여에 의해 HMGB1의 능동적 분비가 억제되어 세포내에 축적되어 있음으로써 오히려 염색이 증가되는 것으로 판단되며 따라서 EP의 투여에 의한 허혈 재관류 예방효과는 HMGB1의 발현에 영향을 주어서 라기 보다는 이미 손상된 조직 혹은 대식구/단핵구에서 HMGB1의 분비를 감소시킴으로써 나타나는 현상일 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문을 작성하는데 많은 기여를 한 최성훈 이은주 연구원에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

- 1) Tsung A, Hiroyuki T, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Me* 2005;201:1135-43.
- 2) Brand K. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:355-64.
- 3) Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune response. *Nature reviews* 2004;4:469-78.
- 4) Park JS, Fabia GR, Qianbin H, Daiva S, Kim JY, Derec S, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Anirban B, Ishizaka A, Edward A. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:C917-24.
- 5) Yotov WV, St-Arnaud R. Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the nonhistone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:3516.
- 6) Wang H, Bloom M, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, ManoQue KR, Faist E, Araham E, Anderson J, Anderson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285:248-51.
- 7) Yang HM, Ochani JLi. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:296-301.
- 8) Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The Nuclear protein HMGB1 is secreted by monocyte via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002;3:995-1001.
- 9) Zuqhaier SM, Zimmer SM, Datta A, Carson RW, Stephens DS. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun* 2005;73:2940-50.
- 10) Yang R, Gallo DJ, Baust JJ, Uchiyama T, Watkins SK, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G212-21.
- 11) Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L. Cholinergic agonist inhibit HMGB1 release and improved survival in experimental sepsis *Nat Med* 2004;10:1216-21.
- 12) Chen G, Li J, Qiang X, Czura CJ, Ochani M, Ochani K, Ulloa L, Yang H, Tracey KJ, Wang P, Sama AE, Wang H. Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: and additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J Lipid Res* 2005;46:623-7.
- 13) 정구용, 정규영, 안형준, 주만기, 장혜경, 이우정, 한평림, 김유선. 신장 허혈 재관류 손상에 미치는 Ethyl Pyruvate의

- 효과. *대한외과학회지* 2007;72:345-50.
- 14) Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81:643-54.
 - 15) Wald R, Waikar SS, Liangos O, Pereira BI, Chertow GM, Laber BL. Acute renal failure after endovascular vs open repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2006;43: 460-6.
 - 16) Matas AJ, Payne WD, Simmons RL, Buselmeier TJ, Kjellstrand CM. Acute renal failure following blunt civilian trauma. *Ann Surg* 1977;185:301-6.
 - 17) Tsuchihashi S, Zhai Y, Bo Q, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 mediated cytoprotection against liver ischemia and reperfusion injury: inhibition of type-1 interferon signaling. *Transplantation* 2007;83:1628-34.
 - 18) Zhang LT, Yao YM, Lu JQ, Yan XJ, Yu Y, Sheng ZY. recombinant bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin induced High-Mobility Group Box 1 protein gene expression in sepsis. *Shock* 2007;2:Publish Ahead of Print.
 - 19) Akaike H, Kono K, Sugai H, Takahashi A, Mimura K, Kawaguchi Y, Fujii H. Expression of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in gastric cancer. *Anti-cancer Res* 2007;27:449-57.
 - 20) Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:3639-45.
 - 21) Ulfgren AK, Grundtman C, Borg K, Alexanderson H, Andersson U, Harris HE, Lundberg IE. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum* 2004;50:1586-94.
 - 22) Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution: a novel resuscitation fluid. *Minerva Anesthesiol* 2001;67:190-2.
 - 23) Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med* 2001;29:1513-8.
 - 24) Tsung A, Kaizu T, Nakao A, Shao L, Bucher B, Fink MP, Murase N, Geller DA. Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation* 2005;79:196-204.
 - 25) Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med* 2003;29:2050-8.
 - 26) Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12351-6.