

일측성 요로폐쇄에 의한 실험적 신 간질 섬유화에서 Phosphodiesterase(PDE) 억제제의 항 섬유화 작용

서울대학교 의과대학 소아과학교실
하일수, 엄은영, 강희경, 한혜원, 박혜원, 정해일, 최 용

= Abstract=

Antifibrotic Effects of Phosphodiesterase (PDE) Inhibitor in Experimental Interstitial Fibrosis induced by Unilateral Ureteral Obstruction.

Il Soo Ha, M.D., Eun Young Um, M.D., Hee-Gyung Kang, M.D., Hye Won Hahn, M.D.,
Hye Won Park, M.D., Hae Il Cheong, M.D., and Yong Choi. M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Phosphodiesterase (PDE) inhibitor increases the cellular content of cAMP, and cAMP suppresses connective tissue growth factor (CTGF) expression induced by TGF- β 1. Therefore, we investigated whether PDE inhibitor suppresses renal fibrosis without suppression of TGF- β 1.

Materials and Methods: Renal interstitial fibrosis was produced by ligation of left ureter in Sprague-Dawley rats. Cilostazol, a selective PDE3 inhibitor, and dipyridamole, a hybrid PDE5, PDE6, and PDE8 inhibitor, were provided in drinking water for 7 days. In addition to the Masson-trichrome score of renal tissue, the concentration of fibronectin and TGF- β 1 in renal tissue-conditioned media was measured by ELISA.

Results: Masson-trichrome score and fibronectin concentration were significantly lower in cilostazol-treated group compared to the control group ($P < 0.05$). Though dipyridamole treatment seemed to suppress the Masson-trichrome score and fibronectin concentration too, the decrements were not statistically significant. There was no difference in TGF- β 1 concentration among the groups.

Conclusion: A selective PDE3 inhibitor cilostazol suppresses renal fibrosis without alteration of TGF- β 1 expression. (*J Korean Soc Pediatr Nephrol* 2002 ; 6 : 85-91)

Key Words : Phosphodiesterase (PDE) inhibitor, Cilostazol, Dipyridamole, Interstitial fibrosis, Unilateral ureteral obstruction, Rat

서 론

대상 및 방법

신 섬유화로 인한 만성 신부전은 불치의 병으로 아직 완전한 치료 방법이 없다. 임상에서는 흔히 혈압 조절, 특히 renin-angiotensin계의 차단제, 저단백식 또는 단백뇨와 고지질혈증의 치료 등으로 섬유화의 진행을 억제하려고 노력하고 있으나 그 효과는 아직 불완전하다 1).

최근 transforming growth factor-β1 (이하 TGF-β1)이 신 섬유화의 기전에서 핵심적 역할을 함이 밝혀지면서 이를 직접 표적으로 하는 치료법이 제시되었다 2). 그러나 TGF-β1은 섬유화 작용 이외에도 세포증식 억제, 면역 억제, 기관발생 (organogenesis) 등 다양한 생물학적 기능을 가지므로 3), TGF-β1을 표적으로 하는 치료는 여러 가지 부작용을 초래할 위험성을 갖고 있다.

TGF-β1의 섬유화 촉진 작용에만 국한된 downstream mediator로 connective tissue growth factor (이하 CTGF)가 알려져 있는데, 이 cytokine은 주로 섬유아세포에 작용하여 세포 증식과 세포외 기질의 생산을 증가시키며 섬유화를 촉진한다 4).

관련 phosphodiesterase (이하 PDE) 억제제는 세포내 cyclic-3',5'-adenosine monophosphate (이하 cAMP)와 cyclic-3',5'-guanosine monophosphate (이하 cGMP)의 분해를 억제함으로써 cAMP 또는 cGMP를 증가시키는데 5), 이 중 cAMP는 TGF-β1에 의한 CTGF 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다 6).

그러므로 저자들은 PDE 억제제가 CTGF 억제를 통해 섬유화를 억제하는 효과를 가져올 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 일측성 요관 폐쇄로 인한 백서의 신간질 섬유화에서 이 가설을 검증해 보고자 본 연구를 시행하였다.

체중 250g 정도의 Sprague-Dawley 백서 24마리 (한국실험동물주, 서울)를 3군으로 나누어 실험에 사용하였다. 실험군 (cilostazol 군과 dipyridamole 군)에서는 요관 결찰 24시간 전부터 각각 cilostazol (한국 오츠카 제약, 서울) 1 g/L 와 dipyridamole (한국 베링거 인겔하임, 서울) 750 mg/L가 첨가된 음료수를 공급하였다. 약제의 침전을 줄이기 위해 음료수에 현탁부형액 (50% carboxymethyl cellulose sodium 용액)을 10%의 농도로 첨가하고 매일 2회 물병을 흔들어 주었다. 대조군에서는 같은 농도의 현탁부형액만을 첨가한 음료수를 공급하였다. 모든 백서에게 보통의 사료가 공급되었다.

서로 다른 음료수를 공급하기 시작한 24시간 후 ether 마취 하에서 좌측 늑측추각을 절개하고 좌측 요관을 4.0 silk로 2회 결찰하여 일측성 요관 폐색을 유발하였다. 요관 결찰 후 각 군의 동물들에게 약제가 포함된 음료수를 1주일 후 도살시까지 계속 공급하였다.

요관 결찰 일주일 후 ether 마취하에서 복강을 열고 복부대동맥을 통해 차가운 phosphate buffered saline (PBS)을 주입하여 신장을 관류하였다. 좌측 신장에 수신증이 발생한 것을 확인하고 적출하였다. 적출된 신장의 피막을 제거하고 그 일부를 10% formalin에 고정하였다. 고정된 조직은 paraffin에 포매한 후 5µm의 두께로 절편하여 Masson-trichrome 염색을 하였다. 조직의 염색 정도를 문헌에 기술된 방법에 따라 10) 반정량적으로 평가하였다.

나머지 신 조직은 신우를 제거하고 피질과 수질을 포함하는 신조직을 면도날로 잘게 쪼갬다. 이후 PBS로 세척하고 insulin (0.1U/mL)과 Hepes buffer (25mM/L, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 serum free RPMI 에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 신조직 조건배지를 획득하여 protease inhibitor cocktail을 첨가하고 -70°C에서 ELISA 분석시까지 보관하였다. 이 조건배지에서 TGF-β1과 fibronectin의 농도를 ELISA법으로 정량하였다. TGF-β1의 정량은

접수 : 2002년 1월 21일, 승인 : 2002년 3월 30일
책임저자 : 하일수, 서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대학교 어린이병원 소아과. 전화: 02) 760-2858 FAX : 02) 743-3455 E-mail : ilsooha@snu.ac.kr
이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 (04-2000-029)의 지원에 의해 이루어졌음.

Quantikine TGF- β 1 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였고, fibronectin의 정량은 Rennard등¹¹⁾의 방법에 따라 저자들이 자체 구성한 ELISA system을 사용하였다.

실험결과는 평균±표준오차로 표시하고, 통계적 분석은 SPSS for Windows R 9.0.1을 이용하여 Mann-Whitney U법으로 하였으며, 5%의 유의수준으로 검증하였다.

결 과

1. Masson-Trichrome score

Masson-Trichrome score는 대조군의 3.50 ± 0.09 에 비해 cilostazol 군에서 2.94 ± 0.20 로 유의하게 낮았다 ($P=0.039$). Dipyridamole군의 score는 3.20 ± 0.12 로 대조군에 비해 낮아 보였으나 근소한 차이로 통계적 유의성을 보여주지 못했다 ($P=0.053$) (Fig. 1). 대표적인 조직 소견은 Fig. 2와 같다.

2. 신조직 조건배지의 fibronectin

신조직 조건배지에서 fibronectin의 농도는 대조군의 5.77 ± 0.72 ng/mg total protein에 비해 cilostazol군에서 3.75 ± 0.43 ng/mg total protein으로 유의하게 낮

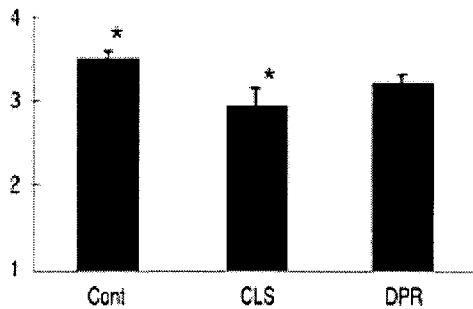


Fig. 1. Interstitial Masson-trichrome scores.

Cont: Control group, CLS: cilostazol group, DPR: dipyridamole group

* $P < 0.05$

Fig. 2. Photomicrographs of the representative tissue from each group.

A: control group, B: cilostazol group, C: dipyridamole group

Misson-trichrome stain, 100x.

았다 ($P=0.043$). Dipyridamole군에서는 3.89 ± 0.42 ng/mg total protein으로 통계적 유의성은 보여주지 못했으나 대조군에 비해 낮은 평균치를 보였다 ($P=0.055$) (Fig. 3).

3. 신조직 조건배지의 TGF- β 1

신조직 조건배지의 TGF- β 1 농도는 대조군, cilostazol군, dipyridamole군에서 각각 632 ± 68 pg/mg total protein, 592 ± 90 pg/mg total protein, 528 ± 59 pg/mg total protein로 세 군간에 유의한 차이가 없었다 ($P>0.05$) (Fig. 4).

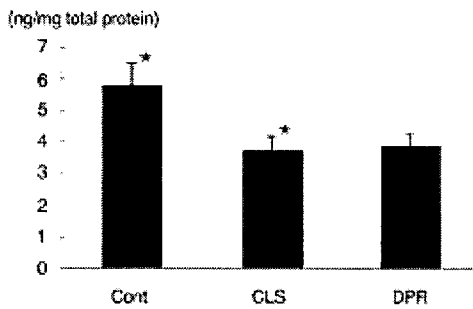


Fig. 3. Fibronectin levels in the tissue-conditioned media.

Legends: refer to Fig. 1.

* $P < 0.05$

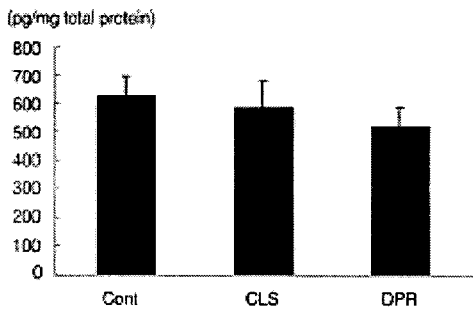


Fig. 4. Transforming growth factor- β 1 levels in the tissue-conditioned media.

Legends: refer to Fig. 1.

고 찰

cAMP와 cGMP는 세포내 신호전달에서 중요한 역할을 하는 물질이다. cAMP와 cGMP의 세포내 양과 그 생물학적 효과는 이 물질들의 합성효소인 adenylyate cyclase, guanylate cyclase와 이들의 분해효소인 cyclic 3', 5'-nucleotide PDE 간의 균형에 달려있다. 특히 대부분의 세포에서 합성효소의 합성속도는 PDE의 분해속도보다 느리기 때문에 cAMP turnover의 주된 결정인자는 PDE이다. 그러므로 작은 PDE 활성도의 변화도 cAMP의 양과 이후의 신호전달에는 큰 영향을 미칠 수 있다¹²

최근의 분자생물학의 발전과 함께 밝혀진 PDE의 유전자와 단백질구조의 차이에 의해 PDE에는 여러 종류(gene family 혹은 type)가 있음이 알려졌다. 이들을 처음에는 로마숫자로 구분하다가 (예 PEF III) 1994년부터 아라비아 숫자로 구분하기로 약속하였으며 (예 PDE3), 포유류에서는 지금까지 9가지 PDE (PDE1-PDE9)가 알려져 있다⁸. 이 중 PDE3, PDE4, PDE7, PDE8은 cAMP에 주로 작용하고 PDE5, PDE6, PDE9은 cGMP에 주로 작용하며, PDE1과 PDE2는 둘다에 작용한다⁸.

척추동물의 PDE는 isogene을 가지고 있어 subtype으로 구분되며, subtype은 다시 alternative splicing이나 alternative transcription initiation site에 의한 isoform으로 구분되기도 한다¹³.

PDE 억제제는 크게 PDE의 type에 관계없이 작용하는 비선택적 혹은 제1세대 PDE 억제제와 특정 type에만 선택적으로 작용하는 선택적 혹은 제2세대 PDE 억제제로 구분된다⁸. 비선택적 PDE 억제제는 theophylline 같은 methyl xanthines, papaverine 같은 isoquinoline derivatives 등을 포함하며 지금 임상에서 사용되고 있는 약제들이다. 선택적 PDE 억제제는 특정 PDE와 결합하는 힘이 강해서 이들에게만 매우 강한 억제 효과를 가진다¹⁴. 선택적 PDE 억제제도 한 가지 뿐 아니라 두가지 이상의 PDE에 작용하는 것이 있는데 이들을 hybrid PDE 억제제라고 부른다.

본 실험에 사용된 cilostazol은 강한 PDE3 억제제

로서 혈전색전성 질환 (thromboembolic disease)에 사용되고 있는 약제이다¹⁵⁾. 이외에도 심부전 치료제로 임상에서 사용되고 있는 milrinone이 PDE3 억제제에 속한다. Dipyridamole은 PDE5 억제제로 알려져 있었으나 최근 PDE6, PDE8의 억제도 하는 것으로 밝혀진 대표적 hybrid PDE 억제제이다¹⁶⁾.

한편, CTGF는 주로 섬유아세포에 작용하여 세포 증식, 세포의 기질 생산의 증가를 통해 섬유화를 촉진하며¹⁷⁾, 5/6 신 절제 모델¹⁸⁾, streptozotocin 유발성 당뇨병¹⁹⁾, 당뇨병성 *db/db* mice²⁰⁾, 사람의 진행성 신염에서 TGF- β 1과 함께 발현이 증가함이 알려져 있다²¹⁾.

그런데 앞에서 기술한 바와 같이 PDE3, PDE4, PDE7, PDE8 억제제는 세포 내 cAMP를 증가시키며, cAMP는 다시 TGF- β 1에 의한 CTGF의 발현을 억제한다⁹⁾. 그러므로 PDE3, PDE4, PDE7, PDE8 억제제는 CTGF의 발현 억제를 통해 신 섬유화를 억제할 수 있을 것이라는 가설을 세웠으며, 본 연구의 결과로 이것이 확인되었다.

신질환에서 PDE 억제제의 효과를 확인한 것은 이 연구가 처음은 아니다. 오래 전 Watanabe 등은 당뇨병성 신병증에서 cilostazol을 사용하여 요단백의 감소를 보고하였으며²²⁾, 최근에 Tsuboi 등은 PDE3 억제제와 PDE4 억제제가 cAMP-PKA pathway의 활성화를 통해서 메산지움 증식성 신염을 억제한다고 발표하였다²³⁾. 한편 Chen 등은 비선택적 PDE 억제제인 pentoxifylline도 메산지움 증식성 신염의 억제 효과가 있음을 보고하였다²⁴⁾. 또 nephrotoxic nephritis에서 PDE4 억제제인 rolipram의 질병예방 효과도 보고되었고²⁵⁾, ischemia-reperfusion injury에서 PDE4 억제제의 손상 억제효과도 보고되었다²⁶⁾.

그러나 저자들은 일측성 요관폐쇄에 의한 신 간질 섬유화에서 PDE3 억제제인 cilostazol의 섬유화 억제 효과를 연구한 문헌은 찾을 수 없었다. 본 연구에서 CTGF의 발현도를 직접 측정하지 않았으므로 이런 효과가 CTGF의 억제에 의존하고 있는지는 확인되지 않았다. 그러나 cilostazol에 의한 섬유화의 억제에 TGF- β 1의 발현 감소가 동반되지 않았기 때문에 최소한 이 작용이 TGF- β 1의 억제를 통한 것은 아님이

확실하다. 앞으로 CTGF의 발현도 평가를 통하여 cilostazol에 의한 섬유화 억제가 CTGF의 발현 감소를 통한 것인지를 확인할 필요가 있다.

한 글 요 약

서 론 : Phosphodiesterase (PDE) 억제제는 세포 내 cAMP를 증가시키며, cAMP는 TGF- β 1에 의한 connective tissue growth factor (CTGF)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 저자들은 PDE 억제제가 TGF- β 1의 변화 없이 신 섬유화를 억제할 수 있는지를 확인해 보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 : 백서에서 일측성 요관 결찰로 신 간질 섬유화를 유발하였다. 실험군에서는 PDE3 억제제인 cilostazol (1 g/L)이나 PDE5, PDE6, PDE8의 hybrid 억제제인 dipyridamole (750 mg/L)이 첨가된 음료를 공급하였다. 일주일 후 신장을 적출하여 Masson-trichrome score를 평가하고, 신조직 조건배지에서 fibronectin과 TGF- β 1을 ELISA법으로 정량하였다.

결 과 : 대조군에 비해 cilostazol 군에서 Masson-trichrome score와 신조직 조건배지의 fibronectin 농도가 유의하게 낮았다($P < 0.05$). Dipyridamole군의 Masson-trichrome score와 조건배지의 fibronectin 농도도 대조군에 비해 낮아 보였으나 통계적 유의성을 보여주지 못했다. 신조직 조건배지의 TGF- β 1 농도는 대조군, cilostazol군, dipyridamole군간에 차이가 없었다.

결 론 : 선택적 PDE3 억제제인 cilostazol은 TGF- β 1의 억제에 의존하지 않고 일측성 요로 폐쇄에 의한 신 섬유화를 억제하였다.

참 고 문 헌

1. Navis G, de Jong PE, de Zeeuw D. Specific pharmacologic approaches to clinical renoprotection. In *The Kidney*, 6th

- ed. (vol 2), edited by Brenner BM, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000, pp. 2341-72*
2. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta-1. *Nature* 1990;346:371
 3. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Yu, Pierschbacher MD, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;360:361-4
 4. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, et al. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996;50:148-55
 5. Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, et al. Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999;55:465
 6. Robert AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β . *Growth Factor* 1993;8:1-9
 7. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β action on fibroblast. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:171-9
 8. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 1999;55:29-62
 9. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF- β -stimulated CTGF expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 1998;12:1151-61
 10. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994;45(3): 916-27
 11. Rennard SI, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Robey PG. Enzyme-linked immunoassay(ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* 1980;104(1): 205-14
 12. Barber R, Goka TJ, Butcher RW. Cyclic AMP turnover in intact tissue: Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. In *Advances in second messenger and phosphoprotein research (vol 25)*, ed. Strada SJ, Hidaka H, New York, Raven Press, 1992, pp1-11
 13. Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 1994;46:399-405
 14. Nicholson CD, Challiss RA, Shahid M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:19-27
 15. Ochiai M, Isshiki T, Takeshita S, Eto K, Toyozumi H, Sato T, et al. Use of cilostazol, a novel antiplatelet agent, in a post-Palmaz-Schatz stenting regimen. *Am*

- J Cardiol 1997;79:1471-4
16. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA. Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8991-6
 17. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor β response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. Cell Growth Diff 1996;7:469-80
 18. Stenson C, McMahon B, Gupta S, Clarkson M. CTGF expression in the glomeruli following 5/6 nephrectomy: regulation by cytokines and abrogation by ACE inhibitors. J Am Soc Nephrol 1999;10:580 (abst)
 19. Makino H, Mukoyama M, Suganami T, Yahata K. Cloning rat connective tissue growth factor and its expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. J Am Soc Nephrol 1999;10:686 (abst)
 20. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C. Regulation of CTGF activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol 2000;11:25-38
 21. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis, Kidney Int 1998;53:853-61
 22. Watanabe J, Sako Y, Umeda F, Nawata H. Effects of cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, on urinary excretion of albumin and prostaglandins in non-insulin-dependent diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 1993;22:53-9
 23. Tsuboi Y, Shankland SJ, Grande JP. Suppression of mesangial proliferative glomerulonephritis development in rats by inhibitors of cAMP phosphodiesterase isozymes type III and IV. J Clin Invest 1996;98:262-70
 24. Chen YM, Chien CT, Hu-Tsai MI, Wu KD, Tsai CC, Wu MS, et al. Pentoxifylline attenuates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. Kidney Int 1999;56:932-43
 25. Tam FW, Smith J, Agarwal S, Karkar AM, Morel D, Thompson EM, et al. Type IV phosphodiesterase inhibitor is effective in prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis. Nephron 2000;84:58-66
 26. Okusa MD, Linden J, Huang L, Rosin DL, Smith DF, Sullivan G. Enhanced protection from renal ischemia-reperfusion injury with A(2A)-adenosine receptor activation and PDE 4 inhibition. Kidney Int 2001;59:2114-25