

급성 허혈성 신손상 후 여러 성장인자 발현의 변화

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 내과학교실*, 임상의학연구소

고양심 · 이수연 · 김 원* · 조수철 · 황평한 · 김정수 · 이대열

Alteration of Growth Factor Expression after Acute Ischemic Renal Injury

Yang Sim Koe, M.D., Soo Yeon Lee, M.D., Won Kim, M.D.*, Soo Chul Cho, M.D.
Pyoung Han Hwang, M.D., Jung Soo Kim, M.D. and Dae-Yeol Lee, M.D.

Department of Pediatrics, Internal Medicine*, and Research Institute of Clinical Medicine,
Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea

Purpose : Regeneration and repair after ischemic renal injury appears to be modulated by circulating or locally produced growth factors. This study examined the changes of serum insulin like growth factor(IGF-I) and renal expression of IGF-I and II, vascular endothelial growth factor(VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), and connective tissue growth factor(CTGF) during the active regeneration period after acute ischemic injury.

Methods : Sera and kidney tissue samples(whole kidney, cortex, outer medullae and inner medullae) were obtained before and after one, three, five and seven days of 40 minutes bilateral renal pedicle clamping. Acute renal failure was assessed by measuring the concentration of serum creatinine. Serum IGF-I level was measured by radioimmunoassay. The mRNA expression in kidney was measured by RT-PCR. The distribution of IGF-I and CTGF was detected by immunohistochemistry.

Results : Serum IGF-I concentration after one day following acute ischemic renal injury was significantly decreased compared to preischemic value. The mRNA levels of IGF-I, IGF-II, TGF- β 1 and VEGF in whole kidney were temporally decreased on day one of ischemic injury. IGF-I and IGF-II expressions in outer medullae were significantly decreased on day one after ischemic injury. TGF- β 1, CTGF and VEGF expressions were markedly decreased in medullae after one day of ischemic injury compared to other kidney sections. IGF-I was markedly decreased in cortical tubules on day one of uremic rat. CTGF was markedly increased on tubule within three days of ischemic injury.

Conclusion : These findings suggest that IGFs, TGF- β 1 and CTGF may involve in the pathogenesis or the recovery from acute ischemic renal injury. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:687-694)

Key Words : Acute ischemic renal injury, Regeneration, Growth factor, IGF-I, IGF-II, TGF- β 1, CTGF, VEGF

서 론

급성 세뇨관 괴사는 비교적 흔한 신장 질환으로 생명을 위협하는 합병증을 초래한다. 여러 원인에 의해 신손상이 초래되며, 신 허혈이나 신 독성 약물에 의해 신세뇨관 세포가 손상된다^{1, 2)}. 이렇게 손상된 세뇨관 상피세포의 재생은 순환하거나 국소적으로 생성된 성장인자나 cytokine, 생리적 인자 및 주위 환경들의

조절에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다^{3, 4)}. 신장은 Insulin-like growth factor(IGF)-I, IGF-II, epidermal growth factor(EGF), hepatocyte growth factor(HGF) 등의 성장인자를 생성하며, 이외에도 fibroblast growth factor(FGF), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), platelet-derived growth factor(PDGF), ciliary neutrophilic factor(CNTF) 등이 급성 허혈성 신손상의 복구에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷⁾. 또한 병변 부위에 침윤된 대식세포에서도 이러한 성장인자들이 생성 분비되며 이러한 성장인자들은 세포분열의 G0시기에 작용하여 DNA 합성을 증가시키고 mitosis를 일으킨다^{3, 8)}.

IGF-I 은 신혈류량과 사구체 여과율을 증가시키고 신세뇨관 세포의 증식 및 분화를 자극하며 국소적으로 신장에서 생성된

본 연구는 전북대학교병원 연구비 (2002년) 지원에 의해 이루어졌음.

접수 : 2003년 3월 8일, 승인 : 2003년 5월 10일

책임저자 : 이대열, 전북대학교병원 소아과

Tel : 063)250-1469 Fax : 063)250-1464

E-mail : leedy@moak.chonbuk.ac.kr

IGF-I은 신장 조직의 재생에 관여될 수 있다는 가능성이 제시되고 있다^{5,9)}. TGF- β 는 새로운 조직이나 재생 조직의 형성과정을 조절하는 중요한 성장인자로 간엽세포에서는 성장촉진 효과를 내피세포와 상피세포에서는 성장억제 효과를 나타낸다^{10,11)}. TGF- β 의 성장억제효과는 PDGF나 connective tissue growth factor(CTGF)에 의해서 간접적으로 매개된다^{11,12)}. 또한 TGF- β 는 신장의 섬유화 과정에서 아주 중요한 성장인자인데 과다한 세포외기질을 동반한 신장질환에서 TGF- β 의 발현이 증가된다¹⁴⁾. Vascular endothelial growth factor(VEGF)는 강력한 혈관 내피세포의 증식과 혈관형성 및 미세혈관의 투과성을 증가시키는 강력한 mitogen으로 여러 사구체질환이나 신혈관질환에서 VEGF의 발현의 변화가 보고되었다^{15,16)}.

이번 연구에서는 Sprague-Dawley Rat에서의 급성 허혈성 신손상 후 신기능 회복에 따른 혈중 IGF-I의 변화와 전체 신장 조직과 각 부위에서 IGF-I, -II, VEGF, TGF- β 1, CTGF의 mRNA 발현의 변화를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

Sprague-Dawley 수컷 쥐(200-250 g)를 phenobarbital sodium으로 마취하여(30 mg/kg i.p.) 양측의 신동맥, 신정맥 그리고 요관을 클램프로 40분 동안 잡아서 허혈성 신부전을 유발시킨 후에 혈청 크레아티닌이 상승되는 정도를 측정하여 급성신부전이 유발되는 것을 확인하였다. 수술 전(n=10)과 수술 후 1일(n=10), 3일(n=8), 5일(n=8), 7(n=7)일째에 쥐를 마취하여 꼬리를 통해 혈액을 수집하였고 같은 시기에 양측 신장을 얻은 후에 무게를 측정한다. 다음, 신피질부(renal cortex)와 신수질부(renal medullae) 경계 부위를 육안으로 확인한 후 razor 칼로 분리하여 액화 질소에 저장하였다. 바깥쪽 신수질부(outer medullae)와 안쪽 신수질부(inner renal medullae)로 분리하기 위해서 피질부가 제거된 신장에서 바깥쪽 신수질의 내경계와 안쪽 신수질의 유두 경계부위를 razor 칼로 박리하였다.

2. 신기능의 측정

혈중 크레아티닌은 Astra AS-8(Beckman, USA)을 이용하여 측정하였다.

3. 시료의 전처리

혈청에서 IGF-binding protein 복합체로부터 IGF-I을 분리시키기 위해서 Sep-pak C18 cartilage(Walters, Miliford, MA, USA)를 이용하였다. Sep-pak 용출은 먼저 관류액 0.2 mL에 1.3 mL의 1% trifluoacetic acid(TFA)를 첨가하여 10분간 정제시켜 결합형과 유리형을 분리시킨 다음 4 mL의 100% acetonitrile과 동량의 0.1% acetonitrile, 0.1% TFA로 활성화시킨 Sep-pak C18 cartilage에 시료를 서서히 가하고 이 cartilage를

4 mL의 0.1% acetonitrile과 0.1% TFA 용액으로 용출시켰다. 용출된 시료는 Speed-Vac concentrator(Savant, Hicksville, NY, USA)을 이용하여 건조시켰고 실험시에는 방사면역원충액으로 제조성하여 사용하였다.

4. IGF-I의 tracer 제조 및 IGF-I 방사면역측정법

Chloramine-T method를 약간 변형시킨 방법으로 이전에 기술한바와 같다¹⁷⁾. 혈청 IGF-I 농도 측정은 iodinated IGF-I과 polyclonal anti-IGF-I 항체(Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, USA)를 이용한 방사면역 측정법에 준하였다. IGF-I standard와 400배 희석시킨 혈청 100 μ L에 1:4,000으로 희석시킨 IGF-I 면역혈청 50 μ L를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 각각의 시험관에 [¹²⁵I]IGF-I 20,000 cpm을 첨가하여 4°C에서 18 시간 반응시켰다. 말 혈청 50 μ L와 20% polyethylene glycol 1 mL를 첨가하여 3,000 rpm에서 15분간 원심시켜 radioligand의 결합형과 유리형을 분리시킨 후 pellet에 있는 방사능을 감마계수기를 이용하여 측정하였고 inter-and intra-assay 변이계수는 각각 6%, 3%이었다.

5. 면역조직화학법

IGF-I 항체 및 CTGF 항체(gift from prof Oh, OHSU, USA)를 이용한 신장 조직의 면역조직화학법은 이미 기술한 방법에 의하였다¹⁷⁾. 일차항체로 IGF-I 항체는 1:100으로 CTGF 항체는 1:200으로 희석하여 사용하였고 biotin이 conjugate된 이차 항체의 희석 비율은 1:1,000이었다.

6. RNA 추출 및 RT-PCR

신장 조직을 Polytron homogenizer로 1% betamercaptoethanol을 함유한 0.4 M guanidinium thiocyanate 용액에서 분쇄시켜 total RNA를 추출하고 분리된 total RNA를 7.5 M CsCl 용액을 이용하여 원심시켜 정제하였으며 그 농도는 분광광도계로 측정하였다. Reverse transcription(RT)은 42°C에서 4 μ g RNA와 200 U murine leukemia virus transcriptase(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 20 μ L의 용액에서 1 시간 동안 이루어졌다. Polymerase chain reaction (PCR) 증폭은 5 μ L의 RT 산물, 10 pmol의 primer, 1.25 U Taq polymerase(Promega, Madison, WI, USA)와 1 mM의 dNTP으로 시행하였다. 증폭효소 연쇄 반응 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성반응, 55°C에서 1분간 결합반응, 72°C에서 1분 30초간 연장반응을 35회 시행하였다. 증폭된 DNA 10 μ L를 취해 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 이번 실험에 사용된 primer는 다음과 같다.

- ① IGF-I sense : CACAGGCTATGGCTC
antisense : CTTCTGAGTCTTGGG
- ② IGF-II sense : CGATGTTGGTCTTTCTCA
antisense : GGGGTCTTTGGGTGGTAA
- ③ TGF- β 1 sense : CGCTTCTGCTCCCACTCC

Table 1. Body Weight Losses(Δ), Serum Creatinine(Scr) and IGF-I Levels after Acute Ischemic Renal Injury

	Days after ischemic injury				
	0(n=10)	1(n=10)	3(n=8)	5(n=8)	7(n=6)
Δ Body weight loss(g)	0.0 \pm 6.0	14.6 \pm 1.8*	20.8 \pm 4.6*	12.7 \pm 3.1	5.42 \pm 2.1
Scr(mg/dL)	0.89 \pm 0.17	4.1 \pm 0.22*	6.35 \pm 0.38*	3.12 \pm 0.21*	1.21 \pm 0.36
IGF-I(ng/mL)	452.6 \pm 12.8	382.6 \pm 29.7*	516.3 \pm 35.2*	471.8 \pm 41.3	463.1 \pm 21.2

Values are mean \pm SE
*P<0.05 compared with day 0

antisense : CCGTCTCCTTGGTTCAGC

④ CTGF sense : CCAGTGTGAAGACCTACC

antisense : ACCTTAGTGTGCGTTCTG

⑤ VEGF sense : GACCCTGGCTTTACTGCT

antisense : AATGCTTTCTCCGCTCTG

⑥ β -actin sense : GCCAACCGTGAAAAGATG

antisense : CCATACCCAGGAAGGAAG

결 과

1. 혈청 크레아티닌 및 insulin-like growth factor-(IGF-I)의 변화

양측 신동맥을 결찰한 후 1일째부터 체중 감소와 혈청 크레아티닌치의 증가가 관찰되었는데 이러한 변화는 3일째에 가장 현저하였다(Table 1). 신손상 3일째 이후부터는 이러한 변화가 점차 감소하여 7일째에는 거의 정상으로 회복되었다. 혈청 IGF-I은 신손상 후 1일째 382.6 \pm 29.7 ng/mL로 수술 전의 452.6 \pm 12.8 ng/mL에 비하여 현저하게 감소하였다(P<0.05). 그러나 신손상 3일째에는 516.3 \pm 35.2 ng/mL로 증가되었다가 5일째부터는 신손상 전으로 회복되었다(Table 1).

2. 신장의 부위에 따른 성장인자의 변화

Fig. 1에서 보는바와 같이 전체 신장에서의 신기능 회복에 따른 여러 성장인자의 발현변화는 거의 유사하였다. 즉 IGF-I, IGF-II, TGF- β 1 및 VEGF의 mRNA 발현은 허혈성 신손상 후 1일째에 현저하게 감소하였고 신손상 3일째에는 신손상 전에 비해 오히려 더 증가되었으며 7일째에는 거의 신손상 전의 수준으로 회복되었다. 여러 성장인자 중 TGF- β 1은 3일과 5일째에 신손상 전의 2배까지 증가하였다가 7일째에는 신손상 전으로 감소하였고 IGF-II는 5일째에 2배로 증가하였고 이러한 증가는 7일째까지 지속되었다. 그러나 CTGF는 신손상 후 신기능 회복에 따른 현저한 변화는 관찰되지 않았다.

각종 성장인자의 mRNA의 발현 양상은 Fig. 2에서와 같이 신장조직의 부위에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 신피질부에서 IGF-I과 CTGF는 1일째 현저하게 감소하였는데 IGF-I은 3일째 신손상 전의 2배 이상 증가하였다가 정상으로 회복되었으나 CTGF는 7일째까지도 정상 수준으로 회복되지 않았다. 반면에

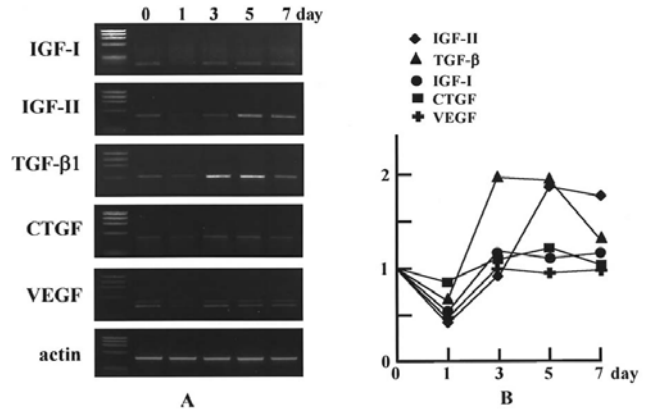


Fig. 1. (A) Expression of growth factors following acute ischemic renal injury. Total kidneys were obtained on day 0, 1, 3, 5 and 7 after ischemic renal injury. (B) Graphs are generated from densitometric analysis of mRNA level of growth factors.

IGF-II, TGF- β 1 및 VEGF는 신손상 1일째에는 감소된 소견을 보이지 않다가 3일째부터 신손상 전보다 증가하였다. 바깥쪽 수질부에서의 IGF-I, IGF-II, TGF- β 1, CTGF 및 VEGF 변화는 동일하였는데 신손상 1일째에는 성장인자의 발현이 현저하게 감소하였다가 3일째에는 신손상 전에 비해 오히려 증가되었고 5일째부터는 정상 수준으로 회복되었다. 안쪽 수질부에서는 1일째에는 모든 성장인자의 발현이 약간 감소되었다가 이후부터 TGF- β 1를 제외하고는 정상수준으로 회복되었다.

3. 각종 성장인자의 mRNA 발현의 변화

IGF-I과 IGF-II는 정상 신장에서는 주로 수질부 특히 바깥쪽 수질부에서 발현되었고 허혈성 신손상 1일째에 현저하게 감소하였다가 3일째에는 정상 수준으로 회복되는 소견을 보였으며 이러한 변화는 바깥쪽 수질부에서 현저하게 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 IGF-II는 신피질부에서 신손상 5일째와 7일째까지도 발현이 증가되어 있었다. TGF- β 1은 정상에서 신수질부에서 주로 발현되었고 1일째는 현저하게 감소하였다가 회복되는 소견을 보였다(Fig. 4). 정상 신장의 피질부에서는 TGF- β 1가 발현되지 않았으나 신손상 3일째부터 TGF- β 1의 발현이 유도되어 7일째까지 지속되었다. CTGF와 VEGF는 정상신장의 수질부와 피질부 모두에서 발현되었으며 신손상 1일째에 현저하게 감소되었

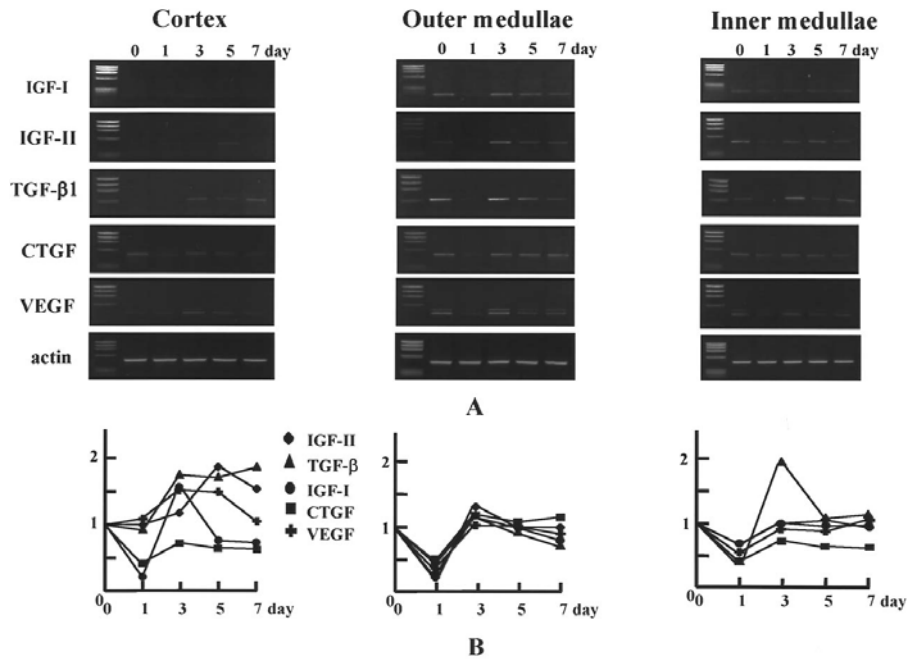


Fig. 2. (A) Expression of growth factors following acute ischemic renal injury. Kidney samples were obtained on day 0, 1, 3, 5 and 7 after ischemic renal injury. **(B)** Graphs are generated from densitometric analysis of mRNA level of growth factors.

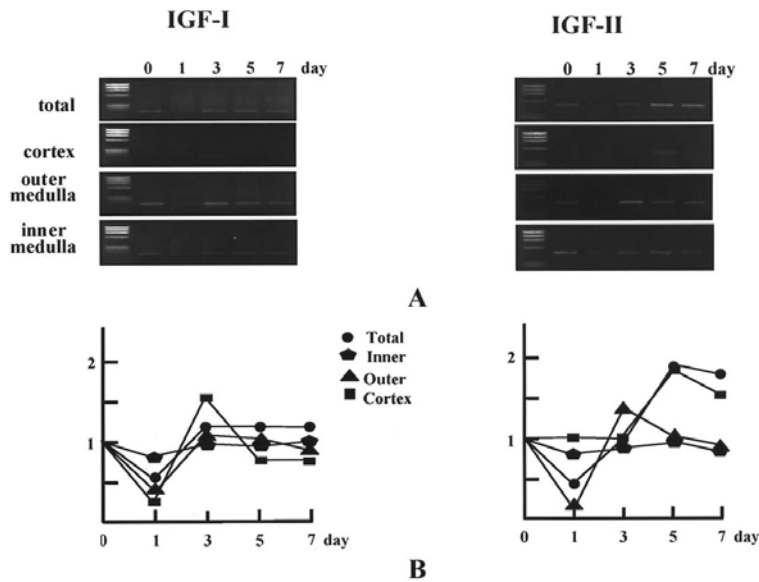


Fig. 3. (A) Expression of IGF-I and IGF-II following acute ischemic renal injury. Kidney samples were obtained on day 0, 1, 3, 5 and 7 after ischemic renal injury. **(B)** Graphs are generated from densitometric analysis of mRNA level of growth factors.

다가 3일째부터 정상 수준으로 회복되는 소견을 보였다.

4. 신장 조직내의 IGF-I과 CTGF의 변화

신장 조직에서의 IGF-I과 CTGF의 분포를 검사하기 위해 anti-IGF-I항체와 anti-CTGF 항체를 이용하여 면역 조직화학

염색을 시행하였다. 정상 백서의 신장에서 IGF-I은 주로 피질부의 신세뇨관에 분포하였고 사구체에서는 발견되지 않았다(Fig. 5A). 급성 허혈성 신손상 후 1일째 신장의 피질부에서는 IGF-I이 현저하게 감소되었다. CTGF는 정상 백서의 신장에서는 주로 혈관에 분포하는 소견을 보였는데 신손상 3일째에는 세뇨관

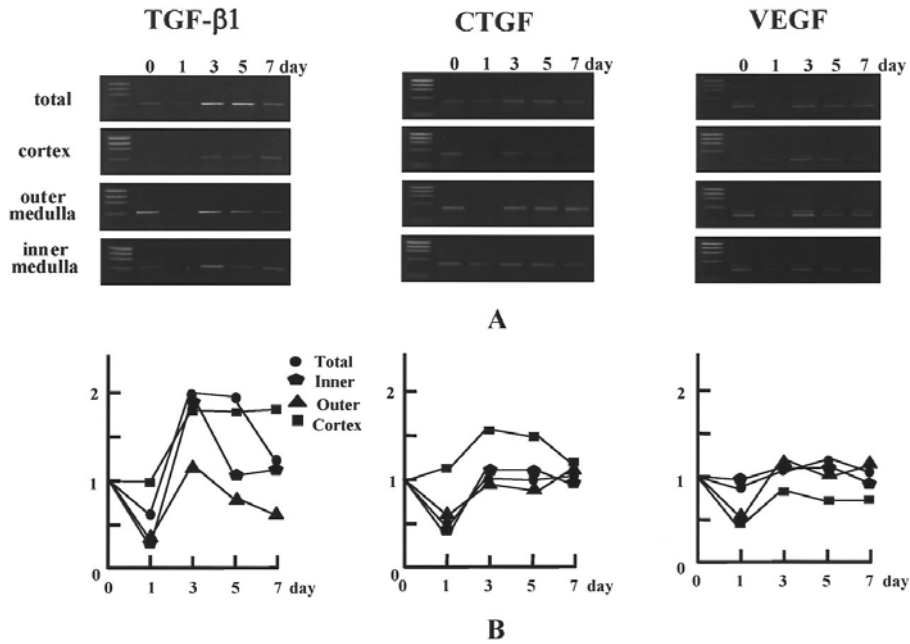


Fig. 4. (A) Expression of TGF-β1, CTGF and VEGF following acute ischemic renal injury. Kidney samples were obtained on day 0, 1, 3, 5 and 7 after ischemic renal injury. **(B)** Graphs are generated from densitometric analysis of mRNA level of growth factors.

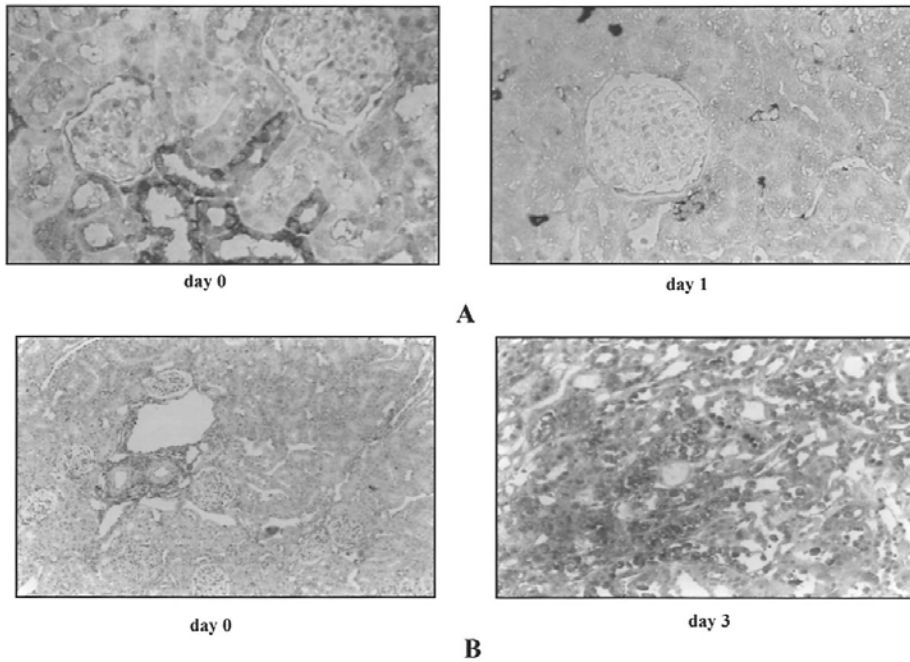


Fig. 5. Representative photomicrographs of histologic section stained with anti-IGF-I antibody(A, ×250) and anti-CTGF antibody(B, ×100). Sections are representative of those originating from 3 rats in preischemic and postischemic rats.

에서 현저한 증가가 관찰되었다(Fig. 5B).

고 찰

급성 신부전은 관상동맥 우회술, 복부대동맥 치환술, 간이식

및 신이식 등의 수술이나 패혈증, 신독성 물질등 허혈성 손상 및 신독성 손상에 의해 유발된다^{1, 2)}. 이렇게 발생한 급성 신부전에서 급성 세뇨관 괴사로 인해 손상된 부위에 주변에 있는 살아남은 세포들이 증식하고 이주하여 그 부위를 복구하는데 성장인자가 관여할 것이라고 생각하고 있다^{3, 4)}. 신실질의 산소화 및 신장내의 미세순환, 조직학적 평가 등을 통해 신수질의 손상이 허혈성 및 신독성 손상에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 바깥 수질은 높은 산소 요구도에 비하여 산소 공급이 제한되기 때문에 허혈성 및 신독성 손상이 직접적인 손상외에도 이 부위의 산소 장력이 감소하고 이러한 혈액동학적 변화는 바깥쪽 수질부에 있는 세뇨관의 손상을 초래한다³⁾. 신손상시 세뇨관세포는 다양하게 반응하는데 근위 세뇨관의 직부의 S3 분절은 이러한 손상에 가장 민감하고 피질의 근위 세뇨관 S1 및 S2 분절은 비교적 손상이 적다. 이렇게 어떤 세포는 괴사되고, 일부는 세포자살에 빠지지만, 일부 세포는 살아남고 살아남은 세포에서 분비된 성장인자가 세포보호 효과를 증가시키고 세포과피반응을 억제하여 세뇨관 세포의 회복과정을 활성화시킨다⁴⁾.

IGF는 여러 장기에서 발현되는 중요한 세포 분열인자로 주로 간에서 생성되고 나머지는 신장을 포함한 여러 조직에서 국소적으로 생산된다¹⁸⁾. 정상 신장에서 IGF-I은 수질 집합관에 주로 분포하며 사구체와 근위 세뇨관에서 발현된다^{19, 20)}. IGF의 생물학적 작용은 tyrosine kinase 수용체인 IGF-I receptor를 통해서 중재되며 또한 IGF는 높은 친화성과 특이성을 갖는 여러 IGF-binding protein(IGFBP) 결합한다²¹⁾. 여러 종류의 IGFBP이 IGF와 결합하여 IGF의 반감기를 증가시키거나 IGF-I 수용체와의 결합을 억제하여 IGF의 작용을 조절한다. 이전의 연구자들에 의해 급성 신손상 2-3일 후에 신피질부와 바깥쪽 수질부의 재생세포에서 IGF-I의 mRNA가 나타나고, IGF 단백질은 허혈성 손상 후 감소하다가 3-7일에 재생 중인 근위 세뇨관 세포에 나타남이 보고되었다^{9, 22)}. 이번 연구에서도 허혈성 신손상 후 3-5일째의 신피질부와 바깥쪽 수질부에서 IGF-I과 IGF-II의 발현이 유의하게 증가하였고 안쪽 수질부에서는 신손상 후 신기능 회복에 따른 IGF 발현의 변화가 관찰되지 않았다. 면역 조직화학 염색에서도 IGF의 분포가 허혈성 신손상 후 1일째 현저히 감소하였고 혈청 IGF-I의 농도가 신손상 후 1일째 감소하였다가 3-5일째 증가하였고 7일째 정상수준으로 회복되었음을 알 수 있었다. 이전의 연구에서 저자들은 허혈성 신손상 후 IGFBP의 발현이 변화한다는 사실을 밝혔다¹⁷⁾. 이상의 결과는 IGF-IGFBP system이 급성 신부전의 복구에 관여한다는 것을 강력하게 시사해준다.

TGF- β 는 여러 종류의 세포에서 강력한 성장저해인자이고 기질단백의 생산을 촉진시켜 섬유화를 증진시킨다^{10, 11)}. TGF- β 는 TGF- β 1, β 2, β 3의 3가지 isoform이 있으며 이들은 비활성화된 상태로 분비된 후 활성화된다. TGF- β 수용체는 serine/threonine kinase 수용체인 type I과 type II가 존재하며 ligand

의 결합에 의해 type I과 type II의 결합이 유도된 후 신호전달이 이루어진다²³⁾. TGF- β 1은 사구체 경화증과 간질성 신질환의 병인에 있어서 중요한 역할을 하며, 제 1형, 3형, 4형 콜라겐과 fibronectin, laminin 같은 세포외기질의 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. TGF- β 1은 신장의 섬유화와 연관된 가장 중요한 isoform으로 정상 백서의 사구체와 원위세뇨관에 발현한다¹⁴⁾. TGF- β 1은 백서의 요관폐쇄에 의한 신손상시 근위 세뇨관, 굵은 상행각, 원위만곡세뇨관에 발현이 증가한다²⁵⁾. 또한 허혈성 신손상 후 12시간 후부터 TGF- β 1의 발현이 증가되고 특히 재생되는 근위 세뇨관세포에 그 발현이 증가됨이 보고되었다²⁵⁾. 이번 연구에서는 TGF- β 1은 정상 백서에서는 주로 바깥쪽 수질부에서 발현되었고 신손상 후 1일째에는 현저하게 발현이 감소되었으며 3일째부터는 정상보다 더 증가되었다. 이는 급성 허혈성 신손상 후의 신기능 회복 과정에 TGF- β 1이 관여될 가능성을 제시하는 것으로 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

CTGF는 cysteine이 풍부한 새로운 성장조절인자 중의 하나로 사람의 제대정맥 내피세포에서 처음 분리되었고 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 신장, 췌장, 뇌척수액, 양수, 복수에서도 발현된다^{26, 27)}. CTGF는 정상 신장에서는 장측 외피세포와 벽측 외피세포에서 주로 발현되는데 사구체신염이나 당뇨병성 신증과 같은 여러 종류의 증식성 및 섬유화성 신질환에서 CTGF의 발현이 증가됨이 보고되었다^{28, 29)}. CTGF는 섬유아세포의 성장과 섬유아세포와 간질세포에서 세포외기질의 분비를 조절하는데 이 유전자는 TGF- β 에 의해 발현이 현저하게 증가되고 TGF- β 의 섬유화 작용을 매개하는 것으로 알려져 있다^{13, 29)}. Dammier 등³⁰⁾에 의하면 동물실험에서 CTGF mRNA는 피부손상 후 12-24시간에 발현이 최대화되고 7일내에 정상수준으로 되돌아갔다. 그러나 지금까지 급성 허혈성 신부전에서의 CTGF의 변화에 대한 보고는 없었다. 저자들은 CTGF가 정상 신장에서는 수질부와 피질부 모두에서 발현되었고 신손상 후 1일째 피질과 바깥쪽 수질부에서 현저하게 감소한 후 정상으로 회복됨을 알 수 있었다. 면역 조직 화학법에서 손상 후 3일째 CTGF의 가 세뇨관에서 현저히 증가함을 볼 수 있었다. 이상의 결과는 CTGF가 허혈성 신손상 후 신기능 회복에 CTGF의 역할을 암시해주는 소견이다.

VEGF는 다양한 기능을 갖는 cytokine으로 내피세포의 증식 이외에 혈관확장, 모세혈관의 투과성증가, plasminogen activator의 발현유도, 백혈구에 대한 화학유인물질(chemoattractant)로서의 기능 등이 있다¹⁵⁾. 사람과 백서의 정상 신장에서는 족세포, 원위세뇨관과 수집관의 상피세포에서 발현되고 근위세뇨관에서는 거의 발현되지 않는다. 그러나 손상을 받은 세뇨관이나 피사성혈관염, 사구체신염에서는 VEGF의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 이러한 신질환에서 VEGF의 발현의 증가는 저산소증의 유도나 IL-1 등의 면역조절 단백질에 기인될 것으로 사료되는데 Awad 등³¹⁾은 사람의 근위세뇨관 세포에서 저산소증과 interleukin-1 β 가 VEGF의 발현을 증가시킴을 보고하였다. 한

편 John 등³²⁾은 허혈성 신손상시 VEGF 합성이 증가되는 것보다 이미 존재하는 VEGF가 재분배되어 내피세포의 손상을 최소화시킨다고 주장하였다. 저자들의 연구에서는 VEGF는 정상신장의 수질부에서 주로 발현되었고 신손상 1일째에는 현저하게 감소하였다가 3일째부터는 정상으로 회복되었다. 따라서 신손상 후 VEGF 발현의 정상으로의 회복이나 증가가 미세혈관의 투과성을 증가시키거나 단핵구의 혈관외유출을 조장하여 신기능 회복이나 세뇨관세포의 회복과정을 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 IGF-I, -II, TGF- β 1, CTGF, VEGF 등과 같은 성장인자가 급성 허혈성 신손상 후 신기능과 세뇨관세포의 회복과정에 관여할 수 있다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 신기능 회복을 촉진시키기 위해 여러 성장인자를 급성신부전 치료제로 사용할 수 있을 것으로 생각되고 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목적 : 급성 허혈성 신손상 후 손상된 세뇨관 상피세포의 재생은 순환하거나 국소적으로 생성된 성장인자나 cytokine, 생리적 인자 및 주위 환경들의 조절에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 따라서 급성 허혈성 신손상 후 신기능 회복에 따른 혈중 IGF-I의 변화와 전체 신장조직과 각 부위에 따른 IGF-I, -II, VEGF, TGF- β 1, CTGF의 mRNA 발현의 변화를 알아보는 데 연구의 목적이 있다.

방법 : 체중이 250-300 g의 백서를 대상으로 급성 허혈성 신손상을 시켜 유발된 급성 신부전 모델을 이용하여 급성 신부전의 진행과정에 따라 혈청 IGF-I치와 여러 성장인자 발현의 변화를 측정하였다. 급성 신부전 진행은 혈청 크레아티닌을 측정하여 평가하였고 혈청 IGF-I 농도는 iodinated IGF-I과 polyclonal anti-IGF-I 항체를 이용한 방사면역 측정법을 이용하여 측정하였다. 신장에서 성장인자의 발현은 RT-PCR을 이용하였고 신장조직에서의 RNA 추출은 통상적인 방법에 준하였다. 신장에서의 IGF-I과 CTGF의 분포는 anti-IGF-I 항체와 anti-CTGF 항체를 이용한 면역조직화학법을 이용하였다.

결과 :

1) 양측 신동맥을 결찰한 후 1일째부터 체중 감소와 혈청 크레아티닌치의 증가가 관찰되었는데 이러한 변화는 3일째에 가장 현저하였다. 혈청 IGF-I은 신손상 후 1일째 현저하게 감소하였고 신손상 3일째에 더 증가되었다가 5일째부터는 신손상 전으로 회복되었다.

2) 신기능 회복에 따른 성장인자의 변화는 거의 유사하였다. IGF-I, IGF-II, TGF- β 1 및 VEGF의 mRNA 발현은 허혈성 신손상 후 1일째에 현저하게 감소하였고 신손상 3일째에는 신손상 전에 비해 증가하였으며 7일째에는 거의 신손상 전의 수준으로 회복되었다.

3) IGF-I과 IGF-II는 정상 신장에서는 주로 수질부 특히 바깥쪽 수질부에서 발현되었고 허혈성 신손상 1일째에 현저하게 감소하였다가 3일째에는 정상 수준으로 회복되었다. TGF- β 1은 정상에서 신수질부에서 주로 발현되었고 1일째는 현저하게 감소하였다가 회복되는 소견을 보였다. CTGF와 VEGF는 정상 신장의 수질부와 피질부 모두에서 발현되었으며 신손상 1일째에 현저하게 감소되었다가 3일째부터 정상 수준으로 회복되는 소견을 보였다.

4) 정상 백서의 신장에서 IGF-I은 주로 피질부위의 신세뇨관에 분포하였고 사구체에서는 발견되지 않았는데 급성 허혈성 신손상 후 1일째 신장의 피질부위에서는 IGF-I가 현저히 감소되었다. CTGF는 정상 백서의 신장에서는 주로 혈관에 분포하는 소견을 보였는데 신손상 3일째에는 세뇨관에서 현저한 증가가 관찰되었다.

결론 : 이번의 연구로 저자들은 IGF-I, IGF-II, TGF- β 1, CTGF, VEGF 등과 같은 성장인자가 급성 허혈성 신손상 후 신기능과 세뇨관세포의 회복과정에 발현의 변화가 초래된다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 신기능 회복을 촉진시키기 위해 여러 성장인자를 급성신부전 치료제로 사용할 수 있을 것으로 생각되고 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Shusterman N, Strom BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maslin G. Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure. *Am J Med* 1987;83:65-71.
- 2) Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993;43:1160-78.
- 3) Liu S, Humes HD. Cellular and molecular aspects of renal repair in acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2:618-24.
- 4) Toback FG. Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 1992;41:2226-46.
- 5) Hammerman MR, Miller SB. Therapeutic use of growth factors in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1984;5:1-11.
- 6) Safirstein R. Gene expression in nephrotoxic and ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1387-95.
- 7) Lim SW, Han KW, Ahn HF, Park JH, Ki YH, Kirsh M, et al. Upregulation of ciliary neurotrophic factor and CNTF receptor in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:749-57.
- 8) Ghielli M, Verstrepen WA, Nouwen EJ, De Broe ME. Regeneration process in the kidney after acute injury: Roles of infiltrating cells. *Exp Nephrol* 1998;6:502-7.
- 9) Tsao T, Wang J, Fervenza FC, Vu TH, Jin IH, Hoffman AR, et al. Renal growth hormone-insulin-like growth factor-I system in acute renal failure. *Kidney Int* 1995;47:1658-68.
- 10) Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5312-6.
- 11) Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW. Growth

- inhibitor from BSC-1 cells is closely related to platelet type β transforming growth factor. *Science*(Washington DC) 1984;226:705-7.
- 12) Soma Y, Grotendorst GR. TGF- β stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J Cell Physiol* 1989;140:246-53.
 - 13) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblast and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993;4:637-45.
 - 14) Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996;49:461-9.
 - 15) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
 - 16) Grone HJ, Simon M, Grone EF. Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. *J Pathol* 1995;177:259-67.
 - 17) 이대열, 박성광, 김정수. 급성 신부전 백서에서 insulin-like growth factor(IGF)-I과 IGF-binding protein의 특성. *대한신장학회지* 1998;17:366-75.
 - 18) Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factor I and II peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989;10:68-91.
 - 19) Humes HD, Lake EW, Liu S. Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 1995;21:353-65.
 - 20) Hirschberg R, Adler S. Insulin-like growth factor system and the kidney: Physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kid Dis* 1998;31:901-19.
 - 21) Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein(IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999;29:761-87.
 - 22) Nishiki M, Murakami Y, Kawaguchi M, Hashimoto R, Hata T, Otani H, et al. Renal expression of insulin-like growth factor-I in acute renal failure: a preliminary report. *Clin Nephrol* 1991;52:148-51.
 - 23) Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2495-508.
 - 24) Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 1992;41:557-9.
 - 25) Basile DP, Rovak JM, Martin DR, Hammerman MR. Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol* 1996;270:F500-9.
 - 26) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: A Cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cell is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991;114:1285-94.
 - 27) Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F933-42.
 - 28) Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 2000;58:1389-99.
 - 29) Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, et al. TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F707-16.
 - 30) Dammier J, Deer H, Brauchle M, Werner S. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. *J Biol Chem* 1998;273:18185-90.
 - 31) Awad BL, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Burgel T, Metzgen E, Fandrey J, et al. Hypoxia and interleukin-1 β stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* 2000;58:43-9.
 - 32) John K, Stuart JM, Scott F, Marina K, David AR. Redistribution of cytoplasmic VEGF to basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2000;57:2445-56.