

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2021.13.2.086>

ISSN 2383-5400 (Online)

# 염분 섭취에 의한 시스플라틴 유도 급성 신장 손상의 촉진과 염증 반응과의 연관성

## Facilitation of cisplatin-induced acute kidney injury by high salt intake through increased inflammatory response

지선영<sup>1</sup>, 황보현<sup>2</sup>, 김민영<sup>1</sup>, 김다혜<sup>1</sup>, 박범수<sup>3</sup>, 박정현<sup>4</sup>, 이배진<sup>4</sup>, 이혜숙<sup>5</sup>, 최영현<sup>6\*</sup>

Seon Yeong Ji<sup>1</sup>, Hyun Hwangbo<sup>2</sup>, Min Yeong Kim<sup>1</sup>, Da Hye Kim<sup>1</sup>, Beom Su Park<sup>3</sup>, Joung-Hyun Park<sup>4</sup>, Bae-Jin Lee<sup>4</sup>, Hyesook Lee<sup>5</sup>, and Yung Hyun Choi<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>석사후연구원, 동의대학교 항노화연구소, 부산, 47340, 대한민국

<sup>2</sup>박사후연구원, 동의대학교 항노화연구소, 부산, 47340, 대한민국

<sup>3</sup>연구원, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산, 47227, 대한민국

<sup>4</sup>연구원, (주)마린바이프로세스, 부산, 46048, 대한민국

<sup>5</sup>연구교수, 동의대학교 항노화연구소, 부산, 47340, 대한민국

<sup>6</sup>교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산, 47227, 대한민국

<sup>1,2,4</sup>Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

<sup>4</sup>Ocean Fisheries & Biology Center, Marine Bioprocess Co., Ltd., Busan 46048, Korea

<sup>3,5,6</sup>Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

(Received 25 November 2021, Revised 2 December 2021, Accepted 2 December 2021)

**Abstract** A high salt diet contributes to kidney damage by causing hypoxia and oxidative stress. Recently, an increase in dietary salt has been reported to induce an inflammatory phenotype in immune cells, further contributing to kidney damage. However, studies on the exact mechanism and role of a high salt diet on the inflammatory response in the kidneys are still insufficient. In this study, a cisplatin-induced acute kidney injury model using C57BL/6 mice was used to analyze the effect of salt intake on kidney injury. Results showed that high salt administration aggravated kidney edema in mice induced by treatment with cisplatin. Moreover, the indicators of kidney and liver function impairment were significantly increased in the group cotreated with high salt compared with that treated with cisplatin alone. Furthermore, the exacerbation of kidney damage by high salt administration was also associated with a decrease in the number of cells in the immune regulatory system. Additionally, high salt administration further decreased renal perfusion functions along with increased cisplatin-induced damage to proximal tubules. This was accompanied by increased expression of T cell immunoglobulin, mucin domain 1 (a biomarker of kidney injury), and Bax (a pro-apoptotic factor). Moreover, cisplatin-induced expression of proinflammatory mediators and cytokines, including cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in kidney tissue, was further increased by high salt intake. Therefore, these results indicate that the kidney's inflammatory response by high salt treatment can further promote kidney damage caused by various pathological factors.

**Keywords** : High-salt, kidney injury, cisplatin, renal perfusion, inflammation

### 서론

고염식이(high salt diet)는 다양한 퇴행성 질환의

\* Corresponding author  
Phone: +82-51-890-3319  
E-mail: [choiyh@deu.ac.kr](mailto:choiyh@deu.ac.kr)

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

발병과 연관성이 매우 높다. 특히 염분에 민감한 고혈압은 고염식이 후 혈압이 비정상적으로 증가하는 것이 특징이며, 이는 심혈관 및 신장의 이환율 증가로 이어진다[1,2]. 신장의 손상은 염분 민감성 고혈압의 발병 원인이 될 수 있으며, 염분에 민감한 고혈압의 발병에는 신장의 산화적 스트레스 증가와 염증 세포의 침윤이 동반된다[2-4]. 나아가 신장 염증은 고염식에 의한 신장 손상에 관여하여 말기 신장 질환으로 이어진다[5,6]. 또한, 신장 섬유증은 만성 신장 질환(chronic kidney disease)이 말기 신부전으로 진행되는 일반적인 경로이며, 신장 간질 섬유아세포의 과도한 증식은 신장 섬유증의 발병에 기여한다[7,8]. 이러한 관점에서 염분의 섭취를 줄이는 것은 만성 신장 질환의 진행을 멈추거나 지연시키기 위해 필수적이다[9,10].

시스플라틴(cisplatin)은 다양한 악성 종양의 치료에 일반적으로 널리 사용되는 백금-기반 항암제이다[11,12]. 이 항암제는 DNA 퓨린 염기와 배위 결합을 형성하여 암세포의 DNA 복구 차단과 세포주기의 정지에 따른 세포사멸을 유도하여 항암 활성을 나타낸다[12-14]. 비록 여러 암에서 시스플라틴의 효능은 현저히 높지만, 미토콘드리아 대사에 영향을 미쳐 미토콘드리아 유래 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시키며, 신장 근위세뇨관 세포에 축적된 ROS는 시스플라틴 유도 만성 신장 질환 및 급성 신장 손상(acute kidney injury, AKI)을 포함한 다양한 부작용 초래와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려졌다[15,16]. 또한, ROS의 생성뿐만 아니라 시스플라틴은 신장 조직의 지질 과산화로 인한 염증 반응의 활성화와 궁극적으로 세포사멸을 유도한다[17,18]. 이러한 측면에서 시스플라틴은 급성 신장 손상의 연구 모델로도 널리 활용된다[19,20]. 그러나 고염식으로 인해 유발된 염증이 어떻게 신장 손상에 관여하는지 아직 정확하게 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 고염 섭취가 신장 손상에 미치는 영향을 분석하기 위하여 C57BL/6 마우스를 이용한 시스플라틴 유도 급성 신장 손상(cisplatin-induced AKI) 모델을 사용하여 신장 손상과 염증 반응과의 연관성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 연구에 사용된 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스(19~23g, (주)코아텍, 평택, 한국)를  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 5\%$  습도의 환경에서 1주일간 순화과정을 거친 후, 12시간 명암 주기와 조도 150~300 Lux로 설정된 사육 환경 조건을 유지하였다. 순화 적응 기간 중 일반 증상을 관찰하고 이상이 없는 동물만을 선택하여 체중 범위에 따른 무작위로 균을 분리한 후 본 실험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(주)코아텍)를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 수돗물을 여과하여 역삼투수(reverse osmotic water)로 만든 후, 자유 음수시켰다. 동물실험은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 사전 심의를 받아 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 수행하였다(승인번호: R2021-014).

### 2. 급성 신장염 모델 및 염분 투여

실험군은 총 4개의 군으로 정상군(Normal), 고염 단독 투여군(S), 시스플라틴 투여군(Cis), 시스플라틴과 고염 투여군(Cis+S)으로 분류하여 각 군당 6마리씩 배치하여 분리하였다. 급성 신장염을 유도하기 위하여 시스플라틴(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 생리식염수에 녹인 후 20 mg/kg의 용량으로 복강 내 1회 0.1 ml 부피로 투여하였다. 본 연구에 사용한 소금은 (주)한주(양주, 한국)에서 구입한 정제염이었으며, 음용수에 용해하여 시스플라틴투여 1시간 전, 시스플라틴 투여 24시간 후, 48시간 후, 총 3회 복강 내로 투여하였다. 정상군은 0.3%의 소금을, 소금 투여군은 4%의 소금을 존데(zonde)를 이용하여 경구 투여하였으며, 마지막 투여 후 24시간이 경과한 시점에 모든 실험동물을 희생시키고 혈액 및 조직을 확보하여 분석을 수행하였다.

### 3. 체중 및 장기 무게 측정

체중은 모든 동물에 대하여 전자체중계로 동일 시간에서 측정하였고 실험 개시일과 실험 종료일 체중을 측정하여 표시하였다. 신장 및 주요 장기들의 무게를 또한 측정하였으며, 신장은 조직학적 관찰을 위해 사용하였다.

### 4. 혈액학적 검사

혈액학적 검사를 위하여 spray-dried K2 ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich Chemical

Co.)가 함유된 튜브에 혈액을 채취하여 혈소판 농도 (platelet, PLT), 백혈구(white blood cell, WBC), 적혈구(red blood cell, RBC), hemoglobin (HGB), hematocit (HCT), 림프구 (lymphocyte, LYM), 혈구 hemoglobin 부피(mean corpuscular volume, MCV) 및 혈구 hemoglobin 농도(mean corpuscular hemoglobin, MCH) 항목에 대한 분석을 대건헬스케어(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

## 5. 혈액 생화학적 검사

혈액 생화학적 검사를 하기 위해 실험동물로부터 채혈된 혈액을 30분 이상 방치하여 응고시킨 다음 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 혈장 요소질소(blood urea nitrogen, BUN), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total-cholesterol (Total-Cho), high density lipoprotein (HDL) 및 low density lipoprotein (LDL) 항목에 대한 분석을 대건헬스케어에 의뢰하여 분석하였다.

## 6. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

신장의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 H&E 염색을 수행하였다. 적출한 신장을 10% formaldehyde 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 고정시킨 후 조직을 파라핀으로 포매하였다. 포매가 끝난 조직은 4 µm 두께로 박절하여 슬라이드 표본을 제작하였다. 제작된 슬라이드는 hematoxylin과 eosin (YD Diagnostics Co., 용인, 한국)으로 염색하고, EVOS FL Auto 2 imaging system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 조직학적 변화를 평가하였다.

## 7. Periodic-acid-Schiff (PAS) 염색

파라핀으로 포매한 신장 조직을 4 µm 두께로 박절하여 PAS kit (Sigma-Aldrich Chemical CO.)를 사용하여 제조사가 제공하는 방법에 준하여 염색한 후, 동의대학교 생체조직재생 핵심지원센터(Core-Facility Center for Tissue Regeneration)의 광학 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 신장 조직의 손상 정도를 분석하였다.

## 8. 면역조직화학적 염색

신장 조직의 파라핀 절편을 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 탈수시킨 후, antigen retrieval solution (Abcam Inc., Cambridge, UK)을 처리하였고 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 30분간 반응시켰다. 면역조직화학적 분석을 위해서 proliferating cell nuclear antigen (PCNA, sc-56, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dalls, TX, USA), T cell immunoglobulin and mucin domain 1 (Tim-1, ab47635, Abcam Inc., Cambridge, UK), Bax (sc-8044, Santa Cruz Biotechnology Inc.), high mobility group box-1 (HMGB-1, ab79823, Abcam Inc.), tumor necrosis factor-α (TNF-α, sc-52746, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2, sc-19999, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 대한 1차 항체를 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체(DAKO Corp, Glostrup, Denmark)를 처리하고 diaminobenzidine peroxidase substrate kit (SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 발색하고 봉입 과정을 거쳐 EVOS FL Auto 2 imaging system으로 염색된 슬라이드를 관찰하였다. 조직에서 발색된 면적의 정량적인 분석은 Thermo Fisher Scientific에서 제공하는 Celleste Image Analysis Software를 사용하였다.

## 9. 통계 처리

모든 실험 결과는 GraphPad Prism® version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)의 one-way ANOVA를 사용하여 통계 분석을 하였으며, Tukey's test로 사후 검정하여  $p < 0.05$  값을 유의한 값으로 처리하고 실험군 간의 유의성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

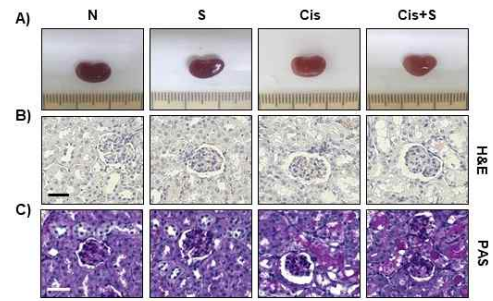
### 1. 신장 및 장기 무게에 미치는 고염 섭취의 영향

고염 섭취가 시스플라틴에 의한 신장 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 신장 조직의 형태학적 변화를 관찰하였다. Figure 1A에 나타난 바와 같이 시스플라틴 투여군의 신장은 혈액 투과도 감소에 의한 선홍색을 나타내었고, 신장 조직의 심각한 부종이 관찰됨으로써 급성 신장 손상이 유도되었음을 확인하였으며, 이는 선행 연구의 결과들과 유사하였다[21,22]. 이와 유사하게 시스플라틴과 고염 투

여군에서도 신장 부종이 관찰되었다. 또한, 체중과 주요 장기 무게 변화를 관찰한 결과, 시스플라틴 투여 후 체중이 다소 감소하였으나 고염 섭취에 의한 체중 변화는 시스플라틴 단독 투여군과 유의적인 차이는 없었다(Table 1). 그리고, 시스플라틴에 의해 흉선, 간, 신장과 비장의 무게가 대조군 대비 유의적으로 감소하였으며, 시스플라틴과 고염 투여군에서도 시스플라틴 투여군과 유사한 경향을 나타내었다.

## 2. 신장 및 간 기능과 혈액학적 지표에 미치는 고염 섭취의 영향

시스플라틴 유도 급성 신장 손상 모델에서 신장 및 간 기능의 변화에 미치는 고염 섭취의 영향을 조사하기 위하여 시스플라틴 처리에 따른 주요 장기의 기능 변화와 시스플라틴 유도 독성에 대한 고염 섭취의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 신장 기능의 일반적인 지표로 흔히 이용되는 BUN와 creatinine의 수준 변화[23,24]를 관찰하였다. Table 2에 요약한 결과에 의하면, BUN은 시스플라틴 단독 투여군에 비하여 약 1.3배 증가하였고 고염 투여군에서는 시스플라틴 투여군에 비하여 유의적으로 증가하였다. Creatinine의 경우도 대조군 대비 시스플라틴 투여군에서 약 1.5배 증가하였고 시스플라틴과 고염 섭취군에서는 시스플라틴 단독 투여군에 보다 더욱 높게 나타났다. 그리고, 간 손상의 지표인 AST와 ALT의 변화를 조사한 결과, 시스플라틴 투여 후 각각 약 114.9 및 24.7 U/L로 대조군 대비 현저하게 증가하였고, 시스플라틴과 고염 동시 투여에 의한 AST와 ALT는 각각 약 117.1 및 23.8 U/L로 시스플라틴 단독 투여군과 유사한 경향을 나타내었다. 한편, 총콜레스테롤, HDL 및 LDL의 수치는 군 간 유의적인 차이가 없었다.



**Figure 1.** Effects of high salt on cisplatin-induced AKT mice. C57BL/6 mice were orally treated with high salt containing 4% NaCl and administered 20 mg/kg cisplatin or vehicle 1 h later *via* intraperitoneal injection. High salt was administered 24 and 48 h after injection, and the mice were sacrificed 24 h after the last dose of high salt. (A) Representative images of kidney morphological changes in each group are presented. (B and C) Kidney tissues and injured-tubules of each group were stained with H&E (B) and PAS (C), respectively, and then observed under a fluorescence microscope. Representative images are presented (scale bar = 50 μm).

다음은 급성 신장 손상 모델에서 혈액학적 변화에 대한 고염 섭취가 미치는 영향을 조사하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 시스플라틴 단독 투여군에서 대조군 대비 혈액 내 혈소판, 백혈구와 림프구가 모두 유의적으로 감소하였으며, 더욱이 시스플라틴과 고염 동시 투여군에서 이들 지표가 모두 유의적으로 억제되었다. 이는 고염 섭취가 면역계 이상을 초래할 수 있을 것이라는 선행 결과들을 잘 뒷받침해주는 결과이다[23,25]. 그러나 혈구 hemoglobin 부피와 hemoglobin 농도는 시스플라틴 단독 투여군과 고염 동시 투여군 사이에서의 유의적인 차이는 관찰되지

**Table 1.** Effect of high salt intake on the body and organ weight of cisplatin-induced nephrotoxicity. The organ weight of all animals was measured after 72 h salt feeding. All data are expressed as mean ± S.D (n = 6, \*\**p*<0.01 and \*\*\*\**p*<0.001 vs normal group)

Group	Body weights (g)		Organ weights (g)					
	Initial	Final	Thymus	Heart	Lung	Liver	Kidney	Spleen
N	21.54 ± 1.52	23.04 ± 1.21	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01	1.16 ± 0.18	0.31 ± 0.03	0.06 ± 0.01
S	21.50 ± 0.85	23.05 ± 1.03	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01	1.15 ± 0.12	0.31 ± 0.04	0.06 ± 0.01
Cis	20.97 ± 1.95	17.87 ± 0.80	0.01 ± 0.00***	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.93 ± 0.09***	0.25 ± 0.03**	0.03 ± 0.01***
Cis+S	21.60 ± 0.34	17.96 ± 0.39	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.92 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.03 ± 0.00

**Table 2.** Effect of high salt intake on the serum biochemical parameters of cisplatin-induced nephrotoxicity. The levels of major biochemical biomarkers in serum were measured after 72 h salt feeding. The data are expressed as mean ± S.D. (n = 6, \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 vs normal group; ###p<0.01 vs cisplatin group)

Group	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	T.Cho (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
N	14.3 ± 0.5	0.33 ± 0.01	106.3 ± 6.1	19.2 ± 0.5	98.2 ± 5.2	50.0 ± 6.5	12.4 ± 1.2
S	16.2 ± 1.7	0.36 ± 0.02	106.8 ± 5.5	20.1 ± 1.4	98.0 ± 5.8	51.1 ± 4.8	12.0 ± 0.3
Cis	19.0 ± 1.5***	0.49 ± 0.05*	114.9 ± 4.6**	24.7 ± 3.2	91.4 ± 6.6	46.0 ± 4.4	9.1 ± 2.5
Cis+S	22.9 ± 0.6###	0.56 ± 0.05###	117.1 ± 3.5	23.8 ± 2.9	88.2 ± 8.3	47.3 ± 4.1	12.6 ± 0.9

**Table 3.** Effect of high salt intake on the hematological parameters of cisplatin-induced nephrotoxicity. The hematological parameters of each group were measured after 72 h salt feeding. All data are expressed as mean ± S.D. (n = 6, \*p<0.05 and \*\*\*p<0.001 vs normal group; #p<0.05 vs cisplatin group)

Group	PLT (10 <sup>3</sup> cells/μL)	WBC (10 <sup>3</sup> cells/μL)	RBC (10 <sup>6</sup> cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	LYM (10 <sup>3</sup> cells/μL)	MCV (fL)	MCH (pg)
N	973.33 ± 66.08	2.73 ± 0.46	9.77 ± 0.28	15.85 ± 0.62	56.07 ± 1.20	2.24 ± 0.51	57.07 ± 0.49	16.22 ± 0.42
S	970.64 ± 59.32	2.61 ± 0.10	9.83 ± 0.19	18.79 ± 0.23	56.57 ± 1.55	2.11 ± 0.09	57.42 ± 0.34	15.78 ± 0.30
Cis	618.50 ± 113.64***	1.38 ± 0.12***	10.36 ± 0.69*	16.43 ± 0.87	57.15 ± 2.74	0.75 ± 0.13***	55.23 ± 1.17***	15.87 ± 0.28*
Cis+S	447.17 ± 92.74#	0.70 ± 0.15#	10.51 ± 0.38	16.40 ± 0.65	57.72 ± 2.10	0.38 ± 0.07	54.62 ± 0.66	15.60 ± 0.13

않았다. 이상의 결과는 급성 신장 손상에 고염 투여는 신장의 손상을 더욱 증대시켰음을 의미하며 이는 면역 기능 저하와 연관성이 있을 것으로 추정된다.

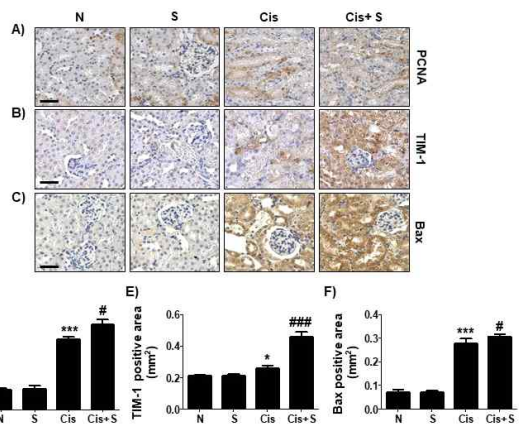
### 3. 신장의 조직병리학적 변화 및 관류조직 손상에 미치는 고염 섭취의 영향

한편 신피질의 근위 세뇨관의 조직학적 변화와 관류조직의 손상은 신장의 기능을 평가하는 대표적인 항목이다[23,26]. 이를 근거로 시스플라틴 투여 후 나타나는 신장 조직 손상에 미치는 고염 섭취의 영향을 조사하기 위하여 H&E 염색에 의한 신장 조직을 관찰한 결과를 Figure 1B에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이, 시스플라틴 투여군에서 신피질의 근위 세뇨관 손상이 현저하게 증가되었고, 이러한 신장 손상에서 나타나는 조직학적 변화가 고염 섭취에 따라 더욱 증가되었다. 그리고 신장에서 관류조직의 손상 정도를 비교하기 위하여 PAS 염색을 수행한 결과, 대조군과 고염 단독 투여군에서 관류조직 세포의 손상이 전혀 관찰되지 않았다. 반면, 시스플라틴 투여에 의한 신장 조직의 세포 손상은 현저히 증가되었고, 이러한 손상은 신장의 관류 기능 저하를 의미하는 cast 형성 및 brush border의 소실 [23,26,27]과 같은 다양한 병변으로 표출되었다. 더

욱이 고염 섭취는 이러한 시스플라틴에 의한 신장 손상을 더욱 악화시켜(Figure 1C).

### 4. 세포증식 및 신장 손상의 바이오마커 발현에 미치는 고염 섭취의 영향

시스플라틴에 의한 급성 신장염 유도 과정에서 신세뇨관 세포의 증식이 활성화되면서 세포사멸이 유발된다[28-30]. 시스플라틴 유도 급성 신장 손상 과정에서 신세뇨관 세포의 증식 촉진을 확인하기 위하여 세포증식 마커에 해당하며 시스플라틴 처리에 의해서도 증가되는 것으로 알려진 PCNA의 발현[30]의 경우, 고염 단독 투여군은 대조군과 유사한 수준이었음에 비하여, 시스플라틴 투여군에서 대조군 대비 약 3.65배로 증가하였고 고염 섭취에 의해 더욱 증가하였다(Figure 2A and D). 그리고 신장 손상 마커인 TIM-1의 발현에 대한 고염 섭취의 영향을 평가한 결과, 대조군과 고염 단독 투여군에서는 TIM-1 발현이 미비하게 나타났지만, 시스플라틴 투여군에서 TIM-1의 발현은 선행 연구의 결과들[31,32]에서처럼 유의적으로 상향 조절되었으며, 시스플라틴과 고염 동시 투여군은 시스플라틴 단독 투여군과 비교하여 약 1.8배 정도 증가하였다(Figure 2B and E).



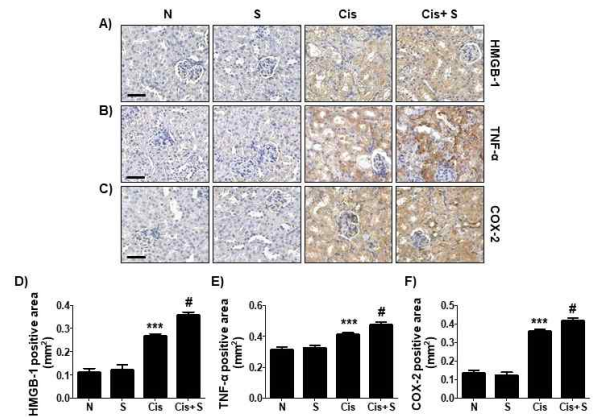
**Figure 2.** Effect of high salt intake on renal tubular cell proliferation and death in cisplatin-induced AKT mice. After treatment in the same condition as in the Figure 1, renal tubule cells were stained with antibodies against PCNA (A), TIM-1 (B) and Bax (C), respectively, and then observed under a fluorescence microscope. Representative images are presented (scale bar = 50 μm). (D-F) PCNA TIM-1 and Bax-positive areas were quantitatively measured. All data are expressed as mean ± S.D. (n = 6, \*\*\**p*<0.001 vs normal group; #*p*<0.05 and ###*p*<0.001 vs cisplatin group).

그리고, 시스플라틴에 의한 신세뇨관 세포의 사멸이 유도되었는지를 확인하기 위하여 대표적인 세포 사멸 유도 인자인 Bax의 발현[33,34]을 확인하였다. Figure 2C 및 F에 나타난 바와 같이, Bax의 발현은 고염 단독 투여군에서는 대조군과 통계적 유의성이 나타나지 않았으나 시스플라틴 투여군의 신장 조직에서는 대조군에 비해 약 3.96배 증가하였으며, 시스플라틴과 고염 동시 투여군에서는 시스플라틴 단독 투여군에 비해 약 1.1배 증가하였다. 이상의 결과는 시스플라틴에 의한 급성 신장 손상 유도 과정에는 신세뇨관 세포의 과도한 증식이 유발되면서 이들 세포의 사멸 증가가 동시에 이루어지고 있으며, 고염 섭취는 이러한 효과를 증폭시켜 신장 손상을 더욱 증가시켰음을 의미한다.

**5. 신장 조직의 염증성 매개 인자 및 사이토카인의 발현에 미치는 고염 섭취의 영향**

잘 알려진 바와 같이, 시스플라틴에 의하여 신장 손상이 유도되는 과정에는 염증반응이 동반된다 [28,35]. 따라서 시스플라틴 유도 급성 신장 손상 모델에서 고염 섭취가 염증 반응을 증가시킬 수 있는

지를 확인하기 위하여 염증성 사이토카인의 생성을 증가시켜 급성 및 만성 염증 반응을 촉진하는데 관여하는 HMGB1 [36,37]의 발현 변화를 관찰하였다. Figure 3A 및 D에 나타내었듯이, HMGB1의 발현은 시스플라틴 투여 시 유의적으로 증가하였으며, 고염과 병용 처리군에서 더욱 증가되었다. 한편, 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려졌다며, 신장의 염증성 반응을 유도하는데 관여하는 TNF-α의 경우[6,38]도 이와 유사하게 고염 투여군에서는 대조군과 비교하여 두드러진 변화가 관찰되지 않았으나, 시스플라틴 투여군에서 유의적으로 증가하였으며, 시스플라틴과 고염 투여군에서는 시스플라틴 단독 처리군에 비해 약 1.2배 증가되었다(Figure 3B and E).



**Figure 3.** Effect of high salt intake on kidney inflammation in cisplatin-induced AKT mice. After treatment in the same condition as in the Figure 1, renal tubule cells were stained with antibodies against HMGB-1 (A) TNF-α (B) and COX-2 (C), respectively, and then observed under a fluorescence microscope. Representative images are presented (scale bar = 50 μm). (D-F) HMGB-1, TNF-α and COX-2-positive areas were quantitatively measured. All data are expressed as mean ± S.D. (n = 6, \**p*<0.05 and \*\*\**p*<0.001 vs normal group; #*p*<0.05 vs cisplatin group).

또한, 대표적인 염증 매개 물질인 prostaglandin E2의 생성에 관여하는 COX-2 [6,39]는 대조군에 비하여 시스플라틴 투여군에서 약 2.7배 증가하였고, 시스플라틴과 고염 동시 투여군에서 시스플라틴 단독 처리군에 비하여 약 1.17배 더 증가하였다(Figure 3C and F). 이상의 결과는 시스플라틴 처리에 의한 신장 손상과정에 염증성 반응이 동반되며, 고염의 섭취는

이를 더욱 증가시켰음을 의미한다. 본 연구의 결과는 고염 처리에 의한 신장의 염증성 반응은 다양한 병리적 요인에 의한 신장의 손상을 더욱 촉진시킬 수 있음을 의미한다. 비록 본 연구의 조건에서 고염 단독 처리에 의한 유의적인 신장 손상이 관찰되지 않았지만, 장기간의 고염에 대한 추가 실험이 요구된다. 이러한 결과는 향후 고염 섭취의 위험성을 제시하는 근거로 활용될 것이다.

## 결론

본 연구의 결과에 의하면 시스플라틴 처리에 의한 신장 부종이 고염 섭취에 의해 더욱 악화되었으며, 신장 및 간 기능 손상 지표들도 시스플라틴과 고염 처리군에서 유의적으로 증가되었다. 이러한 신장 손상의 악화는 면역조절계 세포들의 수치 저하와 연관성이 있었고, 고염 투여는 시스플라틴에 의한 근위 세뇨관의 손상과 신장의 관류 기능을 더욱 저하시켰다. 그리고 신장 손상 바이오마커인 TIM-1의 발현 증가와 세포사멸 유도 인자인 Bax의 발현 상승을 동반하였고, 시스플라틴에 의한 신장 조직의 염증성 유도 인자들의 발현이 고염 섭취에 의하여 상승되어, 고염 섭취는 다양한 병리적 요인에 의한 신장 손상의 악화 요인으로 작용할 수 있음을 의미한다.

## 감사의 글

이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(유산균이 살아있는 고농도 발효 GABA 소금의 개발 및 상용화 계획, 과제번호 20200073).

## References

1. Bovée, D. M., Cuevas, C. A., Zietse, R., Danser, A. H. J., Mirabito Colafella, K. M., Hoorn, E. J. 2020. Salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease: Distal tubular mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 319, F729-F745
2. Majid, D. S., Prieto, M. C., Navar, L. G. 2015. Salt-sensitive hypertension: perspectives on intrarenal mechanisms. *Curr. Hypertens. Rev.* 11, 38 - 48.
3. Ren, J., Crowley, S. D. 2019. Role of T-cell activation in salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 316, H1345-H1353.
4. Mattson, D. L. 2014. Infiltrating immune cells in the kidney in salt-sensitive hypertension and renal injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307, F499-508.
5. Hirohama, D., Fujita, T. 2019. Evaluation of the pathophysiological mechanisms of salt-sensitive hypertension. *Hypertens. Res.* 42, 1848 - 1857.
6. Lu, X., Crowley, S. D. 2018. Inflammation in salt-sensitive hypertension and renal damage. *Curr. Hypertens. Rep.* 20, 103.
7. Saritas, T., Kramann, R. 2021. Kidney allograft fibrosis: Diagnostic and therapeutic strategies. *Transplantation* 105, e114-e130.
8. Liu, F., Zhuang, S. 2019. New therapies for the treatment of renal fibrosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1165, 625 - 659.
9. Kalantar-Zadeh, K., Jafar, T. H., Nitsch, D., Neuen, B. L., Perkovic, V. 2021. Chronic kidney disease. *Lancet* 398, 786-802.
10. Molina, P., Gavela, E., Vizcaíno, B., Huarte, E., Carrero, J. J. 2021. Optimizing diet to slow CKD progression. *Front. Med. (Lausanne)* 8, 654250.
11. Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., Kumar, S. 2021. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *J. Exp. Pharmacol.* 13, 303-328.
12. Brown, A., Kumar, S., Tchounwou, P. B. 2019. Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *J. Cancer Sci. Ther.* 11, 97.
13. Achkar, I. W., Abdulrahman, N., Al-Sulaiti, H., Joseph, J. M., Uddin, S., Mraiche, F. 2018. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *J. Transl. Med.* 16, 96.
14. Dasari, S., Tchounwou, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364-378.
15. McSweeney, K. R., Gadanec, L. K., Qaradakh, T., Ali, B. A., Zulli A., Apostolopoulos, V. 2021, Mechanisms of cisplatin-induced acute kidney injury: Pathological mechanisms, pharmacological interventions, and genetic mitigations. *Cancers (Basel)* 13, 1572.
16. Xiang, X., Guo, C., Tang, C., Cai, J., Dong, Z. 2019. Epigenetic regulation in kidney toxicity: Insights from cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* 39, 152-158.
17. Gentilin, E., Simoni, E., Candito, M., Cazzador, D., Astolfi, L. 2019. Cisplatin-induced ototoxicity: Updates on molecular targets. *Trends Mol. Med.* 25, 1123-1132.

18. Hajian, S., Rafieian-Kopaei, M., Nasri, H. 2014. Renoprotective effects of antioxidants against cisplatin nephrotoxicity. *J. Nephroarmacol.* 3, 39-42.
19. Holditch, S. J., Brown, C. N., Lombardi, A. M., Nguyen, K. N., Edelstein, C. L. 2019. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3011.
20. Perše, M., Večerić-Haler, Ž. 2018. Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: Characteristics and challenges. *Biomed. Res. Int.* 2018, 1462802.
21. Taghizadeh, F., Hosseinimehr, S. J., Zargari, M., Karimpour Malekshah, A., Talebpour Amiri, F. B. 2020. Gliclazide attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibiting NF-kappaB and caspase-3 activity. *IUBMB Life* 72, 2024-2033.
22. Abdelrahman, A. M., Al Suleimani, Y., Shalaby, A., Ashique, M., Manoj, P., Al-Saadi, H., Ali, B.H. 2019. Effect of levosimendan, a calcium sensitizer, on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol. Rep.* 6, 232-238.
23. Griffin, B. R., Faubel, S., Edelstein, C. L. 2019. Biomarkers of drug-induced kidney toxicity. *Ther. Drug Monit.* 41, 213-226.
24. Lin, S., Lin, W., Liao, C., Zhou, T. 2020. Nephroprotective effect of mesenchymal stem cell-based therapy of kidney disease induced by toxicants. *Stem Cells Int.* 2020, 8819757.
25. Wen, Y., Yan, H. R., Wang, B., Liu, B. C. 2021. Macrophage heterogeneity in kidney injury and fibrosis. *Front. Immunol.* 12, 681748.
26. Sankhe, R., Kinra, M., Mudgal, J., Arora, D., Nampoothiri, M. 2020. Neprilysin, the kidney brush border neutral proteinase: a possible potential target for ischemic renal injury. *Toxicol. Mech. Methods* 30, 88-99.
27. Frazier, K. S., Ryan, A. M., Peterson, R. A., Obert, L. A. 2019. Kidney pathology and investigative nephrotoxicology strategies across species. *Semin. Nephrol.* 39, 190-201.
28. Dong, Q., Jie, Y., Ma, J., Li, C., Xin, T., Yang, D. 2019. Renal tubular cell death and inflammation response are regulated by the MAPK-ERK-CREB signaling pathway under hypoxia-reoxygenation injury. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 39, 383-391.
29. Belavgeni, A., Meyer, C., Stumpf, J., Hugo, C., Linkermann, A. 2020. Ferroptosis and necroptosis in the kidney. *Cell. Chem. Biol.* 27, 448-462.
30. Potočnjak, I., Domitrović, R. 2016. Carvacrol attenuates acute kidney injury induced by cisplatin through suppression of ERK and PI3K/Akt activation. *Food Chem. Toxicol.* 98, 251-261.
31. Brooks, C. R., Bonventre, J. V. 2015. KIM-1/TIM-1 in proximal tubular cell immune response. *Oncotarget* 6, 44059-44060.
32. Karmakova, T. A., Sergeeva, N. S., Kanukoev, K. Y., Alekseev, B. Y., Kaprin, A. D. 2021. Kidney injury molecule 1 (KIM-1): a multifunctional glycoprotein and biological marker (Review). *Sovrem. Tekhnologii. Med.* 13, 64-78.
33. Zhao, X. C., Livingston, M. J., Liang, X. L., Dong, Z. 2019. Cell apoptosis and autophagy in renal fibrosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1165, 557-584.
34. Soetikno, V., Sari, S. D. P., Ul Maknun, L., Sumbung, N. K., Rahmi, D. N. I., Pandhita, B. A. W., Louisa, M., Estuningtyas, A. 2019. Pre-treatment with curcumin ameliorates cisplatin-induced kidney damage by suppressing kidney inflammation and apoptosis in rats. *Drug Res. (Stuttg)* 69, 75-82.
35. Yang, R., Zhu, S., Tonnessen, T. I. 2016. Ethyl pyruvate is a novel anti-inflammatory agent to treat multiple inflammatory organ injuries. *J. Inflamm. (Lond)* 3, 13:37.
36. Zhao, Z., Hu, Z., Zeng, R., Yao, Y. 2020. HMGB1 in kidney diseases. *Life Sci.* 15, 259:118203.
37. Chen, Q., Guan, X., Zuo, X., Wang, J., Yin, W. 2016. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta. Pharm. Sin. B.* 6, 183-188.
38. Mehaffey, E., Majid, D. S. A. 2017. Tumor necrosis factor-alpha, kidney function, and hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 313, F1005-F1008.
39. Basu, S. 2007. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2 alpha from physiology to new principles in inflammation. *Med. Res. Rev.* 27, 435-468.