

복막의 섬유화 기전으로서의 상피중간엽전이

도 준 영

영남대학교 의과대학 내과학교실

Epithelial to Mesenchymal Transition in CAPD Patients

Jun Young Do

*Department of Internal Medicine,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an important etiologic factor for the development of peritoneal fibrosis in CAPD patients. Mesothelial cells are main source of trans-differentiated fibroblasts under stress from the bioincompatible peritoneal dialysate.

In our study there was no difference in dialysate TGF- β and VEGF between the low and high GDP groups during an initial 12 months. However, after adjusting with D-CA125, the low GDPs group showed a significantly lower D-TGF- β /D-CA125 and D-VEGF/CA125 during the initial 12 months. Among the adjusted peritoneal growth factors for CA125, VEGF/CA125 and TGF- β /CA125 were factors significantly associated with greater EMT in this study.

Adjustment of the peritoneal growth factor for effluent CA125 (surrogate for mass of HPMCs) revealed significant association with EMT suggesting that the fibroblastoid transition from HPMCs could be affected by the amount of intraperitoneal growth factors (TGF- β , VEGF) per unit mass of HPMCs. There was significant improvement in both cell score and D-CA125 at the sixth and 12th months after switching from a high GDPs solution to a low GDPs solution. Use of icodextrin solution in patients who had average peritoneal transport showed not only better systemic effects such as decreased glucose absorption via dialysate but also preservation of the peritoneum, including less EMT and high mesothelial bulk mass.

In conclusion, Therapy with low GDP solution including icodextrin may positively impact preservation of the peritoneal membrane integrity and prevention of peritoneal fibrosis with time on PD.

Key Words: EMT, CAPD, Peritoneal growth factors

서 론

만성신부전 환자의 신 대체 요법으로 사용되는 복막투석은 잔여신기능보존이 뛰어나고 심혈관계 안정성이 좋은 장점 등 여러 가지 특징을 가짐으로 최근에는 혈액투석 전에 시행하는 통합적인 신 대체 요법(Integrated renal replacement therapy)의 개념으로 활용되는 경향이다. 복막투석으로 인해 인체의 복막의 중피세포는 낮은 산도, 완충제(젓산), 고농도의 포도당, 고 삼투압과 포도당분해 산물 등의 생체 부적합한 투석액에¹⁾ 하루 8리터 년 3,000리터 이상의 지속적인 자극을 견디어 내야 하는 상황에서 복막을 잘 보존하여 오랜 기간 동안 인공 신장 막으로서의 기능을 유지하도록 하는 것이 중요하겠다. 복막투석을 오래 하는 경우 복막은 섬유화를 통한 복막 비후를 보이게 되어 결국 복막투석을 유지하지 못하게 되는 상황에 이르게 된다. 복막 투석액이 개발된 이래 현재까지 가장 널리 사용되면서 안정성이 검증된 삼투 물질로 포도당이 있다. 포도당을 복강 내에 주입하기 위해서는 멸균과정이 필요하며 고온멸균과정에서는 포도당에서 후기 당화 산물(glucose degradation products, 이하 GDP)이 발생하게 되며 이것이 계속적으로 복막에 접촉하면서 복막에 악영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.^{2) 3)} 최근 이 GDP의 생성을 줄이기 위한 방법으로 고농도의 포도당 및 강한 산

성 상태에서 고온 소독을 시행하면 GDP 생성이 최소화 됨을 이용하여 실제 복막 투석액 제조 시 투석액을 여러 방으로 나누어(multichamber) 한쪽에는 고농도의 포도당을 강한 산성상태로 유지하고 다른 쪽에는 완충액 및 전해질 물질을 주입하게 되었다.^{4) 5)} 이렇게 만들어진 복막 투석액은 열소독 및 보관하는 동안 GDP 생성을 최소화 시킬 수 있으며 사용직전에 혼합하여 복강 내로 주입하게 되면 GDP에 의한 복막독성을 감소시킬 수 있을 것으로 기대되고 있으며 실제 임상에서 적용 후 복막 및 전신적으로 어떤 효과를 얻을 수 있는지에 대한 연구가 진행되고 있다. 본 연구자들이 이 분야에서 많은 연구를 진행하여 결과를 발표 중에 있음으로 저자의 연구를 중심으로 한 복막 섬유화 기전으로서의 상피 중간엽 전이(epithelial to mesenchymal transition, 이하 EMT)에 대해 알아보고자 한다.

본 론

신장질환으로 신세관(renal tubule)이 섬유화되는 과정을 알아보면 사이질 섬유모세포(interstitial fibroblast) 생성의 상당 부분(약 36%)이 질환이 있는 신장의 세관 상피가 EMT를 거치면서 생성되게 되며 10~14% 정도는 골수에서 유래되며 나머지 절반 정도는 국소적 증식을 통해 생성이 되는 것으로 알려져 있

다.⁶⁾ 또한 세관 EMT의 중요한 과정으로는 상피의 부착력 소실을 시작으로 세뇨관 기저막 파괴가 일어나고 세포는 밑부분으로 침투하여 섬유모세포가 생성이 되게 된다. 이 과정동안 TGF- β 가 각각의 과정에서 관여하게 되며 TGF- β 를 억제할 수 있는 것으로 알려진 HGF나 BMP-7는 이와 같은 EMT 일련의 과정이 시작되는 시점부터 억제 할 수 있는 것으로 증명되고 있다.⁷⁾ 복막투석에서도 이와 유사하게 복막중피세포가 생체 부적합한 복막 투석액에 오랜 기간 노출되게 되면 복막상피세포보다는 더욱 힘든 과정을 잘 견딜 수 있는 형태의 세포인 섬유모세포 형태로 바뀌게 되는데 이 과정이 결국 EMT 과정을 거쳐 복막 섬유화가 진행되는 한 기전으로 이해되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 복막투석 환자에서의 EMT를 증명하는 방법으로 저자들이 사용한 방법은 투석액에서 분리 배양된 세포 및 복막투석 환자의 복막조직 시료에서 비멘틴(vimentin) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 8/18염색을 이용하여 증명하였다. 즉, 섬유모세포가 외견상의 형태는 전형적인 섬유모세포의 모양을 보이지만 전형적인 섬유모세포에서는 보이지 않는 염색 소견을 보임을 확인하여 이것이 실제 복막중피세포(human peritoneal mesothelial cell, 이하 HPMC)에서 전이된 세포이며 따라서 HPMC의 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 아침에 배양된 투석액에서 원심 분리된 세포를 HPMC의 배양에 적합하도록 제조된 배양액에서 약 10일 정도 배양하게 되면 어떤 환자는 전형적인 조약돌 모양의 HPMC가 배양되는 반면 어떤 환자는 섬유모세포 형태를 보임을 확인할 수 있었다. 여기에서 섬유모세포로 보이는 세포를 특수 염색을 하여 비교한 결과 HPMC의 특징을 가짐을 확인하였다. 즉,

신체의 일반적인 섬유모세포는 특수 염색상 cytokeratin 8/18에서 음성 소견을 보이거나 투석액에서 분리된 섬유모세포는 cytokeratin 염색에서 양성 소견을 보여 이 세포가 외견상 섬유모세포 같이 보이긴 하지만 실제로는 HPMC가 여러 가지 복막투석의 자극을 받아 살아 남기 위해 유리한 더 강한 형태의 세포인 섬유모세포로 EMT 과정을 거쳐 바뀐 세포로 설명이 될 수 있겠다. 실제로 복막투석을 수년간 시행 후 복막조직 검사를 시행한 환자의 복막을 관찰한 결과 복막중피 하부(submesothelial area) 부위에 cytokeratin 양성 소견을 보이는 세포가 관찰됨을 확인하여 HPMC가 복막액의 자극으로 세포층 밑으로 이동되어 복막 섬유화가 진행됨을 확인할 수 있어 복막에서도 EMT가 중요한 기전임을 확인할 수 있었다. 대상 환자의 야간 복막 저류 된 투석액을 배액하여 여기에 존재하는 세포를 원심 분리하여 HPMC 배양에 적합하도록 제조된 배양액을 사용하여 약 10여 일을 배양하고 광학 현미경 하에서 맹검법으로 세포상태에 대한 스코어링을 실시하였다. Cell score 1은 전형적인 모습의 조약돌 모양의 HPMC 모양을 보이는 경우이며 Cell score 3는 외견상 전형적인 섬유모세포 모양을 보이는 경우로 하였으며 Cell score 2는 두 가지가 혼합된 경우로 정의하고 점수를 부여하였다 (Fig. 1). 복막투석의 치료 기간이 경과하면서 투석액에서 배양된 세포의 Cell score의 변화를 관찰하고 저 GDP 투석액 및 고 GDP 투석액을 사용한 경우 어떤 차이를 보이는지 검정하였다. 무작위 전향적 연구형태로 저 GDP 군과 고 GDP 군으로 분류하여 12개월을 추적검사를 시행한 결과 저 GDP 군이 1, 6, 12 개월에 측정된 Cell score 가 유의하게 낮고 투석

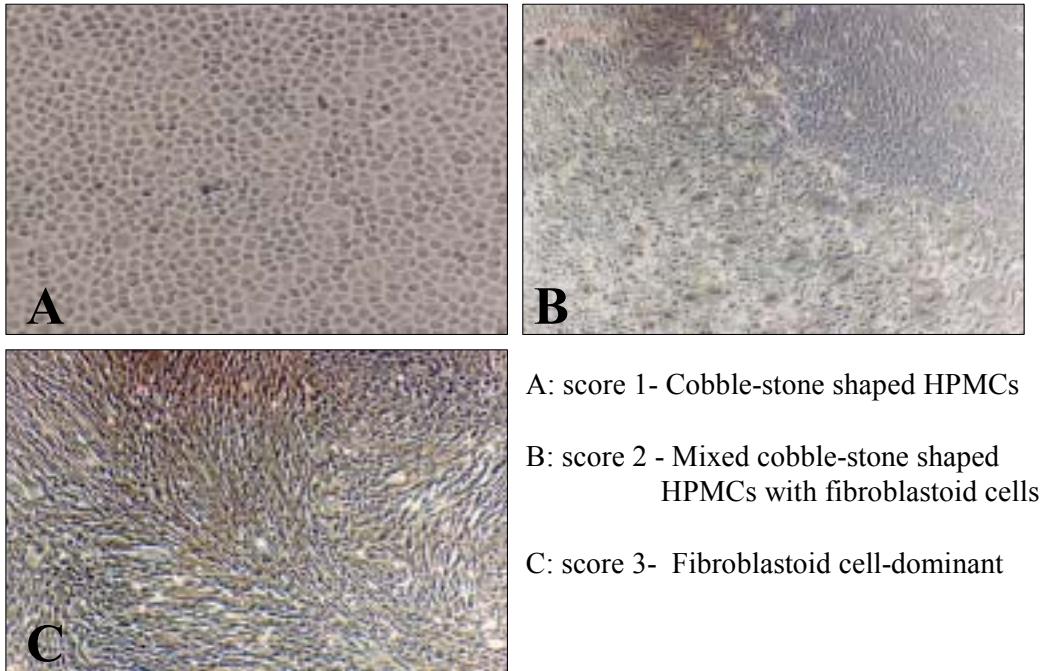


Fig. 1. Cell scores after culturing HPMCs from the overnight effluent. At the 1st, 6th and 12th months after initiation of PD, cells in overnight effluent dialysate were completely isolated with centrifugation. Cells were cultured in the T25 culture flask with M199 media which contain 20% FBS. When cultured cells had nearly reached to confluence on T25, cell scores were blindly measured by the same person under the light microscope (A: score 1- cobble-stone shaped HPMCs, B: score 2- mixed, C: score 3- fibroblastoid cell dominant, x40).

액내 CA125가 유의하게 높게 유지되어 복막의 EMT가 적게 발생하였음을 확인하였다. 또한 고 GDP를 사용하여 12개월의 경과를 본 환자를 대상으로 저 GDP 투석액으로 바꾸고 추가적으로 12개월의 경과를 관찰한 결과 투석액을 저 GDP로 바꾼 후 6, 12개월에 유의하게 Cell score가 낮아지고 투석액 내 CA125도 낮아져 고 GDP 투석액을 사용하여 복막의 손상이 있더라도 저 GDP 투석액으로 교체 시 어느 정도 복막의 손상이 회복됨을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 복막에서의 EMT에 영향을 주는 인자를 알아본 연구가 시행되었으며 이에 따르면 저 GDP 복막액을 사용한 군과 일반적

으로 사용된 고 GDP 복막액을 무작위 배정 후 전향적으로 경과를 관찰한 결과, 저 GDP 투석액을 사용한 경우에 1, 6, 12개월에서 유의하게 높은 투석액내 CA125 수치를 보여, 보다 더 HPMC가 잘 보존되고 있음을 확인할 수 있었다. 복막액내 CA125는 복막의 HPMC 양을 비교적 잘 반영하는 인자로 사용되고 있는 물질이다. In vitro 나 동물실험에서 GDP가 복막에 미치는 영향을 본 여러 연구에서 GDP가 HPMC에 독성을 유발하여 여기에서 분비될 수 있는 여러 성장 인자들의 분비가 감소됨을 보고하고 있다. 그러나 인체에서 이에 대한 연구 결과는 주로 단기적인 효과를 본 것이거

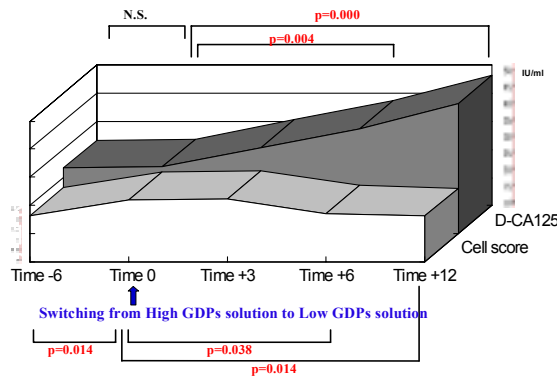


Fig. 2. Comparison of cell score and dialysate CA-125 between Time 0 and other Time in peritoneal dialysis patients. It showed the improvement of cell score and D-CA 125 after switching from high GDPs solution to low GDPs solution with time.

나 해석이 되지 않는 반대의 결과를 보고한 경우가 있는 상태이며 장기적으로 GDP가 복막 투석액 내의 성장인자에 미치는 영향에 대해서는 별다른 연구가 없는 실정으로 정확한 해석이 쉽지 않은 상황이다. 저자들의 연구에 따르면 저 GDP 군에서 배액 된 복막 투석액 내에

존재하는 복막성장인자의 양이 유의하게 높거나 (fibronectin, IL-6, TGF- β induced gene product: Big-h3) 유사한 수치를 보여(TGF- β , VEGF) 저 GDP 군에서 복막성장인자가 낮을 것이라는 기존의 예상¹¹⁻¹³⁾과 반대의 결과를 보였다. 그럼에도 불구하고 저 GDP 군에서 복막

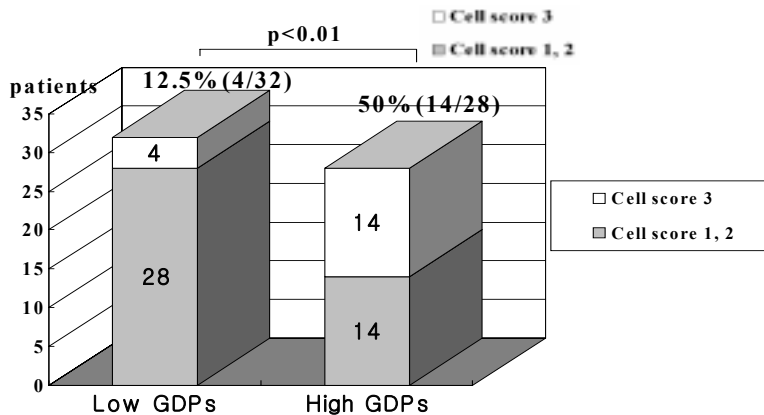


Fig. 3. Comparison of the number of score 3 (fibroblast-dominant culture) between low GDPs and high GDPs groups at the 12th month. The number of fibroblast-dominant cultures (EMT, cell score 3) was significantly lower in the low GDP group (12.5% (4/32) vs. 50% (14/28), $p < 0.01$) at the 12th month.

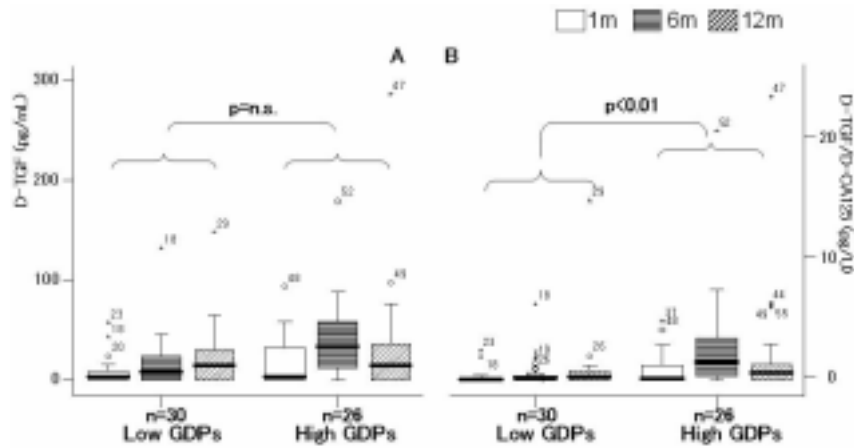


Fig. 4. A,B. Comparison of overall D-TGF-β concentration (A) and adjusted D-TGF-β concentration with D-CA125 (B) between high GDP(HG) and low GDP(LG) groups during initial 12 months. There was no difference of dialysate TGF-β between the low and high GDP groups during initial 12 months (p=n.s., A). But after adjusting with D-CA125, the low GDPs group showed significantly lower D-TGF-β/D-CA125(7.44 ± 12.95 vs. 16.07 ± 24.15 , 16.37 ± 26.08 vs. 38.84 ± 40.20 and 22.22 ± 30.03 vs. 32.71 ± 58.11 pg/U, at the 1st, 6th and 12th months) during initial 12 months ($p < 0.01$, B).

액에서 분리된 세포는 유의하게 EMT 발현이 적은 결과를 보여(Fig. 3) 복막성장인자와 저 EMT 간의 가능한 설명이 필요한 상황이 되겠다. 먼저 저 GDP 군에서 복막성장인자 수치가 적은 것에 대한 가능한 설명으로는 투석액내 복막성장인자의 원천은 복막에 분포된 혈관에서 확산된 것과 일부는 HPMC에서 직접 분비된 것이 포함될 것으로 판단되며 이를 확인하기 위해서 시행한 복막성장인자와 투석액내 CA125 간의 상관관계에서 설명이 가능하겠다. 본 연구에서도 복막내 CA125와 여러 복막성장인자 간에 유의한 양의 상관관계를 보임을 증명하였다(fibronectin, Big-h3, IL-6, VEGF). 앞에서 언급한대로 복막의 섬유화의

한 기전으로 설명한 EMT는 HPMC가 투석액의 생체 부적합적인 자극을 받아 섬유모세포로 바뀐 것이라면 단위 HPMC당 받게 되는 생체 부적합적인 자극 혹은 복막성장인자의 양이 HPMC의 EMT에 중요한 인자가 될 수 있을 것으로 가정될 수 있겠다. 이를 수치로 표시하면 복막성장인자를 투석액내의 CA125로 나눈 값으로 표시할 수 있겠다. 저 GDP 투석액 사용군이 Fibronectin /CA125, IL-6/CA125, TGF-β /CA125, Big-h3/ CA125 및 VEGF/CA125 값이 유의하게 낮음을 확인하였다(Fig. 4, 5). 마지막 검증법으로 위의 복막성장지표가 EMT에 어떤 영향을 주는지에 대한 검정이 시행되었다. 다변량 검증법으로 복막의 EMT에 영향을

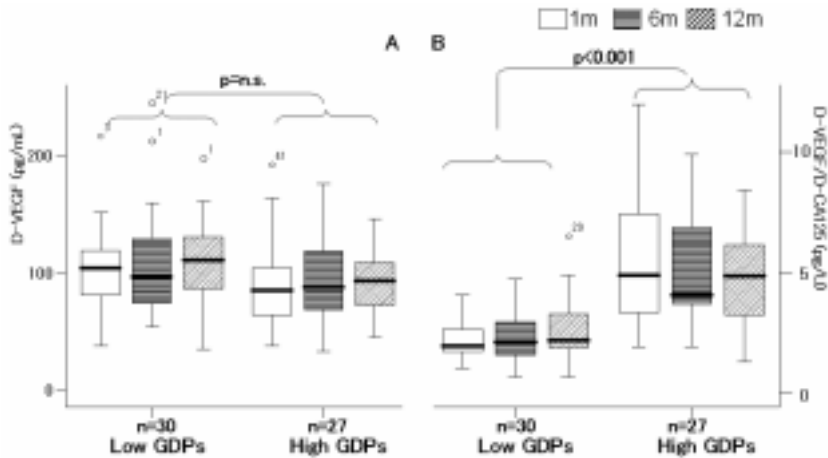


Fig. 5. A,B. Comparison of overall D-VEGF concentration (A) and adjusted D-VEGF concentration with D-CA125 (B) between high GDP(HG) and low GDP(LG) groups during initial 12 months. There was no significance of dialysate VEGF between the low and high GDP groups during initial 12 months ($p=0.08$, A). But after adjusting with D-CA125, the low GDPs group showed significantly different D-VEGF/D-CA125 (2.05 ± 0.75 vs. 5.51 ± 2.74 , 2.13 ± 0.88 vs. 4.94 ± 2.26 and 2.41 ± 1.20 vs. 4.64 ± 1.93 pg/U, at the 1st, 6th and 12th months, respectively) during initial 12 months ($p<0.001$, B).

주는 인자를 분석한 결과 고 GDP 투석액, 적은 양의 HPMC(낮은 CA125) 및 복막성장인자 중에는 TGF- β /CA125 와 VEGF/CA125가 관여인자로 증명되었다. 결국 저 GDP 복막 투석액을 사용할 경우 복막의 EMT를 통한 복막 섬유화를 억제할 수 있음을 증명한 결과로 판단되며 추가적으로 복막성장인자를 단순 비교함으로써 투석환자의 복막상태를 간접적으로 확인하고자 할 때 본 실험의 결과에 따르면 복강내 어떤 이유로 HPMC의 양이 현저히 차이가 나는 경우 이를 고려하지 않고 단순히 복막액 내의 성장인자를 단순 비교하는 것은 잘못된 해석을 만들 수 있으므로 주의하여야 함을 확인할 수 있었다.

이와 같이 저 GDP 복막 투석액이 사용됨으로 복막의 섬유화를 억제하는 국소적인 효과를 확인하였으며 전신적으로 어떤 효과를 기대할 수 있을 지에 대한 검정이 필요하겠다. 유럽에서 시행한 한 연구에서 저 GDP 투석액을 사용한 군에서 하루 동안의 투석을 통한 초 여과량이 유의하게 적음을 보고하였다. 이에 저자들은 투석액 내의 GDP 함량차이에 따른 복막의 용질 투과도에 어떤 영향을 미치는지에 대한 검정을 실시한바, 저 분자 용질 투과도를 나타내는 4시간째 투석액 및 혈액 내 크레아티닌 비(4hr D/P Cr)나 복막의 aquaporin 능력을 반영하는 (1hr D/P Na)를 비교한 결과 두 군에는 유의한 차이를 보이지 않음에도 불구하고

복막기능 검사를 시행하는 동일한 조건하에서의 초 여과 양에서 유의한 차이점이 관찰되었다. 즉 저 GDP 투석액 사용 군에서 고 GDP 투석액 사용 군에 비해 복막투석을 통한 초여과 양이 적을 뿐 아니라 포도당 흡수량이 유의하게 많음을 확인 하였다. 그러나 이를 설명할 정확한 기전에 대해서는 연구가 진행 중에 있어 현재로서는 충분한 설명이 부족한 실정이다.

같은 조건의 복막 상황에서도 저 GDP 군에서 포도당 흡수가 많고 초여과가 적음으로 이 상태를 1년 정도 지속한 경우 임상적으로 환자에서 차이를 보이지 않을지에 대한 검증이 필요하여 해당 두 군의 환자를 생체 임피던스법(bioimpedance analysis, BIA)을 이용하여 검정을 실시하였다. 1년을 경과한 상황에서 부종지수(ECW/TBW)나 체중의 변화량에 차이를 보이지 않아 저 GDP 투석액 사용에 따른 부종이나 체중증가는 관찰되지 않았음을 확인할 수 있었다.

최근 사용되는 복막 투석액 중에 비 포도당 용액의 사용이 가능하게 되었다. 이중에서 포도당 분자를 20여 개 뭉쳐놓은 크기의 아이코텍스트린(icodextrin)은 초 여과의 기전이 기존의 포도당과 다르기 때문에 7~14시간 정도의 장기간 복강 내 존재 시에도 지속적인 초 여과 효과를 유지할 수 있는 장점으로 복막의 수분통로(aquaporin) 장애로 초 여과 장애를 보이거나 높은 용질 투과도로 포도당 흡수가 빨라 초 여과를 오래 유지하기 힘든 환자에게 유용하게 사용될 수 있겠다. 또한 이 용액은 복막을 통한 포도당 흡수를 줄여 비만이나 고 지혈증 발생을 감소시켜 대사증후군 발생을 감소시킬 수 있을 것으로 기대되며 특히 당뇨병환자에서 효과가 기대되고 있다. 이 용액의 또

다른 특징 중에 비 포도당 용액임으로 고열 소독 시 발생하는 GDP가 낮은 일종의 저 GDP 용액의 특성을 나타낸다. 따라서 초 여과 장애나 당뇨뿐 아니라 일반 복막투석 환자에게 하루 7~14시간씩 사용하게 되면 복막에 노출되는 GDP 양의 감소에 따른 복막 보존 효과가 기대될 수 있겠다. 이를 검증하기 위한 방법으로 신환을 대상으로 일반적인 고 GDP 투석액을 사용한 군과 일반적인 고 GDP 투석액을 사용하면서 하루 7~14시간 동안 아이코텍스트린 투석액을 사용한 군을 비교 분석하여 이 용액이 복막에 미치는 효과를 검증하였다. 결과로는 아이코텍스트린을 사용한 군이 투석액에서 배양된 세포에서 세포점수가 훨씬 적어 EMT가 적게 발생하였음을 확인하였고 배액 된 투석액의 CA125의 농도도 유의하게 높게 나와 하루 한번 아이코텍스트린 을 사용하는 것도 복막섬유화를 억제하는 효과를 확인할 수 있어 일반 복막투석 환자에게도 복막기능 보존에 도움이 될 것으로 판단되었다.

결 론

복막투석환자의 복막 경화를 억제시킬 수 있는 저자들의 연구를 종합하면 저 GDP 투석액이나 아이코텍스트린 투석액과 같은 생체적합성을 향상시킨 복막투석액을 사용하게 되면 복막 섬유화의 한 기전인 EMT 발생이 감소됨을 확인하였으며 향후 이와 같은 저 GDP 복막투석용액을 사용하면서 복막의 보존에 도움이 되어 복막투석환자의 투석유지에 도움이 될 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999;55: 341-56.
2. Hendriks PM, Ho-dac-Pannekeet MM, van Gulik TM, Struijk DG, Phoa SS, Sie L, et al. Peritoneal sclerosis in chronic peritoneal dialysis patients: Analysis of clinical presentation, risk factors, and peritoneal transport kinetics. *Perit Dial Int* 1997;17:136-43.
3. Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, Bender TO, Breborowicz A, Gahl GM, et al. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2434-41.
4. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: Influence of time and temperature. *Perit Dial Int* 1995;15:26-32.
5. Lage C, Pischetsrieder M, Aufricht C, Jorres A, Schilling H, Passlick-Deetjen J. First in vitro and in vivo experiences with Stay-Safe Balance, a pH-neutral solution in a dual-chambered bag. *Perit Dial Int* 2000;20:S28-32.
6. Kalluri R, Neilson EG: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis *J Clin Invest* 2003;112(12):1776-84.
7. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:1465-75.
8. Do JY, Kim YL, Park JW, Cho KH, Kim TW, Yoon KW, et al. The effect of low glucose degradation product dialysis solution on epithelial to mesenchymal transition in CAPD patients *Perit Dial Int* 2005;25:S14-17.
9. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348: 403-13.
10. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341-50.
11. Witowski J, Korybalska K, Ksiazek K, Wisniewska-Elnur J, Jorres A, Lage C, et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:917-24.
12. Williams JD, Topley N, Craig KJ, Mackenzie RK, Pischetsrieder M, Lage C, et al. Euro Balance Trial Group The Euro-Balance Trial: The effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int* 2004;66(1):408-18.
13. Kim YL, Do JY, Park SH, Cho K, Park J, Yoon K, et al. Low glucose degradation products dialysis solution modulates the levels of surrogate markers of peritoneal inflammation, integrity, and angiogenesis: preliminary report. *Nephrology* 2003;8(Suppl 2):S28-32.