

미니돼지에서 허혈성 신장 손상의 조기진단

김세은 · 고아라 · 배춘식 · 박수현 · 한호재 · 심경미* · 강성수¹

전남대학교 수의과대학, *남부대학교 방사선학과

(게재승인: 2011년 2월 14일)

Initial Diagnosis of Acute Renal Failure Induced by Ischemia in Miniature Pig

Se-Eun Kim, A-Ra Ko, Chun-Sik Bae, Soo-Hyun Park, Ho-Jae Han, Kyung-Mi Shim* and Seong-Soo Kang¹

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*Department of Radiology, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract : Acute renal injury induced by ischemia is a major cause of high morbidity and mortality in hospitalized patients and a common complication in hospitalized patients. Thus, the work with acute renal failure and renal ischemia has been studied for many years. Although serum creatinine concentration that is widely used as an index of renal function performs fairly well for estimating kidney function in patients with stable chronic kidney disease, it performs poorly in the setting of acute disease. Thus, an ideal biomarker for acute kidney injury would help clinicians and scientists diagnose the most common form of acute kidney injury in hospitalized patients, acute tubular necrosis, early and accurately, and may aid to risk-stratify patients with acute kidney injury by predicting the need for renal replacement therapy, the duration of acute kidney injury, the length of stay and mortality. In this study, renal ischemia and reperfusion were performed by clamping and un-clamping right renal artery in miniature pigs. Plasma blood urea nitrogen (BUN) and creatinine were examined at pre-clamping, after-clamping at 0, 1 and 3 hours. And we searched initial indicators in these samples. Also, renal tissue was collected and searched the initial indicator by PCR and western blotting. As a result, hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α), nuclear factor kappa-B (NF κ B), I κ B, erythropoietin (EPO), erythropoietin receptor (EPOR), angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were showed significant changes among the renal protein. HIF1 α , EPO, and EPOR were showed significant changes among the renal gene. Thus, these markers will be used as initial diagnosis of acute renal failure.

Key words : acute renal failure, biomarker, miniature pig, renal ischemia and reperfusion.

서 론

급성신부전은 급속한 혈류량의 감소 및 신장 독소를 유발시킬 수 있는 독성물질, 요도폐색 등으로 사구체의 기능이 급격히 소실되면서 높은 발생률과 사망률을 나타내는 질환 중의 하나이다(24,28). 허혈로 야기되는 급성신부전은 신장을 즉시 손상시키거나 잠재적으로도 신장의 기능에 영향을 미쳐 치명적인 결과를 야기하므로 지속적인 관리 또한 필요한 질환이다. 비록 다양한 동물모델에서 여러 가지 성공적인 치료 방법에 대한 연구가 진행되었으나 실험적으로 증명된 새로운 임상적 효용은 아직까지 뚜렷하지 않다(1). 급성신부전의 원인 중 하나로 알려진 허혈-재관류에 의한 신 세뇨관 상피세포의 손상은 괴사와 세포자멸사의 기전으로 일어나며 이는 신장으로의 절대적 또는 상대적 혈류가 감소된 상황에서 발

생한다(7,18). 또한 이것은 신장 이식 초기의 신 기능부전의 중요한 원인이 된다(1,4).

임상적으로는 혈청 크레아티닌과 요량의 감소 등이 급성 신장손상의 지표로 이용되고 있다. 그러나 신장손상 시 초기의 관리 및 치료가 중요하나 이러한 지표들은 신장 손상이 진행된 이후에 나타나므로, 초기 신손상을 알려주는 예민한 표지자의 필요성이 대두되고 있다(1). 현재까지 알려진 표지자로는 여러 가지 효소, 성장인자, cytokine, 세포접착단백(adhesion molecules), 응고인자, Transforming growth factor- β (TGF- β) 등이 있으며(1), 이러한 표지자들은 신손상이 상피세포 재생으로 이어지는데 있어 새로운 상피세포 재생에 관여하는 인자로 알려져 있다(3,13,21).

본 연구에서는 허혈-재관류에 의해 신 세뇨관 상피세포의 손상으로 발생하는, 초기 신손상을 알려주는 예민한 urinary marker를 알아보고, p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK)에 의한 TGF- β , TNF- α 이외의 급성신손상에 발현되는 유용한 biomarker를 알아보고자 하였다.

¹Corresponding author.
E-mail : vetkang@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 PWG Genetics Korea 사의 수컷 미니돼지(30-35 kg) 3마리를 사용하였으며 실험 전 일주일의 적응기간 동안 사육환경은 온도 23 ± 2°C, 상대습도 55 ± 10%로 유지하였으며 충분한 양의 사료와 물을 공급받으면서 사육되었다. 동물의 사육과 실험은 전남대학교 동물실험 지침에 따라 수행되었다(CNU IACUC-YB-R-2008-29).

실험동물의 마취 및 허혈성 신장 손상 유발

미니돼지는 실험 12시간 전에 절식 및 절수를 실시하였으며, 전마취는 xylazine(렘폰®, 바이엘코리아) 2.2 mg/kg과 tiletamine/zolazepam (Zoletil 50®, 버락코리아) 5 mg/kg을 합제하여 근육주사 하였다. 그 후 이정맥에 정맥라인을 확보하고 atropine(항산아트로핀®, 제일제약) 0.05 mg/kg을 정맥으로 천천히 투여하였으며, 삽관 후 isoflurane으로 흡입마취로 마취를 유지하였다. 마취 후, 우측 신동맥을 박리시킨 후 결찰 및 이완이 가능하도록 혈류차단용 겹자를 장착하여 편측성 신장 손상을 유발하였다(허혈-재관류군). 좌측 신동맥은 대조군으로서 결찰하지 않았다(Sham 수술군). 결찰 전, 60분 결찰 후, 재관류 후 1 및 3시간에 biopsy needle을 이용하여 각 군에서 신장조직을 채취하였으며, 혈액 또한 같은 시간에 채취하였다.

Creatinine과 BUN의 측정

우측 신동맥의 결찰 전, 60분 결찰 후, 재관류 후 1 및 3시간에 채취한 혈액에서 3,000 g로 10분간 원심분리하여 상층액인 혈청을 분리한 다음 VetTest®Chemistry Analyzer (IDEXX Laboratories Ltd, Chalfont St Peter, UK)로 혈청 내 creatinine과 BUN을 측정하였다.

RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

Hypoxia inducible factor 1α (HIF1α), tumor necrosis factor-α (TNF-α), epithelial sodium channel gamma (ENaCγ), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), erythropoietin (EPO), erythropoietin receptor (EPOR) 및 actin과 같은 renal gene을 PCR하여 표지자를 모색하였다. Total RNA는 Invitrogen의 TRIzol (Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 추출하였으며,

oligo-dT₁₈ 프라이머와 함께 RT Premix reverse transcription system kit (AccuPower, Seoul, Korea)로 reverse transcription 하였다. 만들어진 RT product로 PCR Premix kit (AccuPower, Seoul, Korea)를 이용하여 증폭반응을 수행하였으며, RT-PCR product를 1.2% agarose에 전기영동하여 ethidium bromide 염색하여 관찰하였다.

Western blot analysis

HIF1α, nuclear factor kappa B (NFκB), IκB, EPO, EPOR, angiotensin II type 1 receptor (AT-1R), angiotensin-1, VEGF 및 actin과 같은 renal protein을 western blotting을 하여 표지자를 모색하였다. Biopsy needle을 이용하여 채취한 각 군의 신장조직은 피질과 수질부를 분리하고 ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA)로 균질화시켰다. 4°C에서 10,000 g로 10분간 원심분리 한 뒤 8-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 전기영동 하였고, 전기를 이용한 이동방법으로 니트로셀룰로오스막에 옮겼다. 니트로셀룰로오스막은 TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20)로 만든 5% 탈지우유를 사용해 1시간동안 비특이적인 결합을 차단한 뒤 1:1000으로 희석된 horseradish peroxidase가 결합된 이차항체를 1시간동안 반응시켜 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 X-ray 필름(Amersham Pharmacia Biotech)에 밴드를 나타나게 하였다.

결 과

허혈-재관류 후 혈청에서의 creatinine과 BUN의 변화

허혈-재관류 후 신기능의 변화를 알아보기 위해 creatinine과 BUN의 변화를 살펴보았다. 결찰 전, 60분 결찰 후, 재관류 후 1 및 3시간에 혈청에서 creatinine과 BUN 농도를 측정하였을 때 Sham 수술군과 허혈-재관류군 모두 전 시간에 걸쳐 유의적인 변화가 없었다(Fig 1).

허혈-재관류 후 발현되는 유용한 biomarker

RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

허혈-재관류 후 신장 조직에서 renal gene의 발현 정도를 살펴보기 위해 허혈시, 재관류 후 1시간, 3시간 뒤 각각 신장

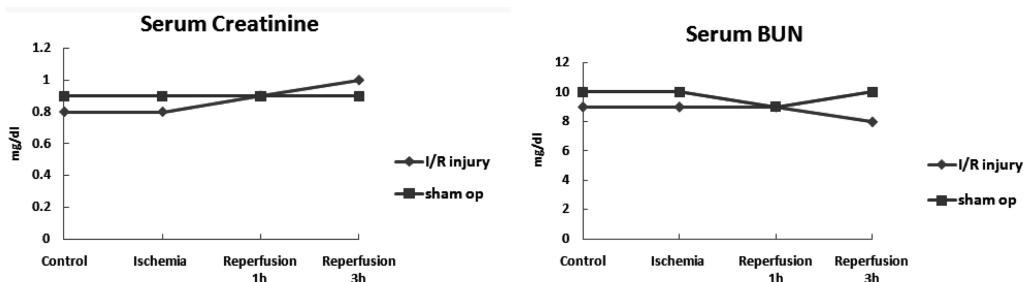


Fig 1. Changes of serum creatinine and BUN during ischemia-reperfusion in miniature pigs.

조직을 채취하여 RT-PCR을 실시하였다. 본 실험에서는 허혈 시 HIF1 α , EPO, EPOR에서 대조군과 비교시 의미있는 변화를 보였다(Fig 2).

Western blot analysis

허혈-재관류 후 신장 조직에서 renal protein의 발현 정도를 살펴보기 위해 허혈시, 재관류 후 1시간, 3시간 뒤 각각 신장 조직을 채취하여 western blotting을 실시하였다. 본 실험에서는 허혈시 HIF1 α , NF κ B, I κ B, EPO, EPOR, Angiotensin-1, VEGF에서 대조군과 비교시 의미있는 변화를 보였다(Fig 2).

고 찰

허혈-재관류에 의한 신장손상은 신장 이식 시 발생할 수 있으며 신 기능부전의 중요한 원인이 된다. 이렇게 발생한 신 부전에서 급성 세뇨관괴사로 인해 손상된 부위의 주변에 살아남은 세포들이 증식하고 이주하여 그 부위를 복구하는데 많은 성장인자가 관여한다(16,25).

본 연구에서 허혈-재관류 후 혈청에서의 creatinine과 BUN은 대조군과 변화시 허혈직후 및 재관류 후 변화는 거의 없었다. 이는 creatinine과 BUN이 임상적으로 신장손상의 지표로 이용되고 있으나 신장 손상이 어느 정도 진행된 이후에 나타나므로(1), creatinine과 BUN의 수치는 급성 신손상의 정도를 나타내는 중요한 인자가 될 수 없는 것으로 판단된다(23). 따라서 급성 신손상 시에는 발현되는 유용한 표지자의 모색이 중요함을 확인할 수 있었다.

EPO는 신장에서 생산되는 성장인자로서 신 기능부전 시 장으로의 철 흡수를 조절한다(22). EPOR은 적혈구 모세포 내

에 존재하며 EPO는 EPOR을 통해 활동한다. 이 때 EPOR은 신부전 시 EPO의 저항력을 높여주는데 기여한다(14). 본 연구에서는 허혈-재관류 후 renal gene과 protein에서 EPO, EPOR가 발현되는 결과를 나타냈다. 이로써 EPO, EPOR가 급성 신손상을 알려주는 표지자로서의 역할을 할 수 있음을 알게 되었다.

VEGF는 강력한 혈관내피세포의 증식과 혈관형성 및 미세혈관의 투과성을 증가시키는 강력한 mitogen으로 여러 사구체질환이나 신혈관질환에서 VEGF의 발현의 변화가 보고되었다(9,10,20,26). 본 연구에서 EPO, EPOR과 같이 VEGF도 발현되는 결과를 나타냄으로써 의미있는 표지자로서의 역할을 할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 VEGF와 같은 혈관생성인자로 angiotensin-1도 발현되어 표지자로서의 역할을 할 수 있게 되었다.

NF κ B는 허혈 및 재관류 시 활성화되는 주된 전사인자로 여겨지고 있으며(17), 재관류 시 cytokine과 자유산소기의존성기전에 의해 활성화된다고 알려져 있다. NF κ B는 전염증성, 전혈액응고성, 혈관활성화 유전자의 전사를 촉진시켜 염증반응을 유도하는 반면(5), 세포 종류에 따라서 세포보호단백질 발현을 유도하여 세포자멸사 및 염증반응을 억제하였다고 한다(6). 다른 연구에서 NF κ B는 재관류 여부와 상관없이 허혈직후 및 재관류 후에도 그 발현이 증가됨이 보고되었다(7). 그리고 자극이 없는 상태에서는 I κ B와 결합된 상태로 존재하지만 IL-1 β , TNF- α , IL-17 또는 바이러스나 phytohemmagglutinin, lipopolysaccharide 등의 자극에 의해 I κ B가 분리되면 핵 내로 이동하여 proinflammatory cytokines, chemokines, inflammatory enzymes, adhesion molecules 등의 발현을 증가시켜 주는 매우 중요한 기능을 가진 전사인자이다(2). NF κ B와 I κ B

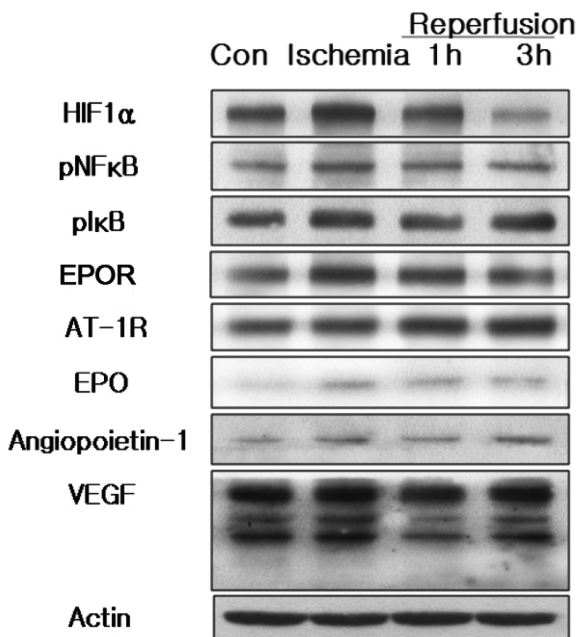


Fig 2. Renal protein expression of injury makers during renal ischemia-reperfusion injury in miniature pigs.

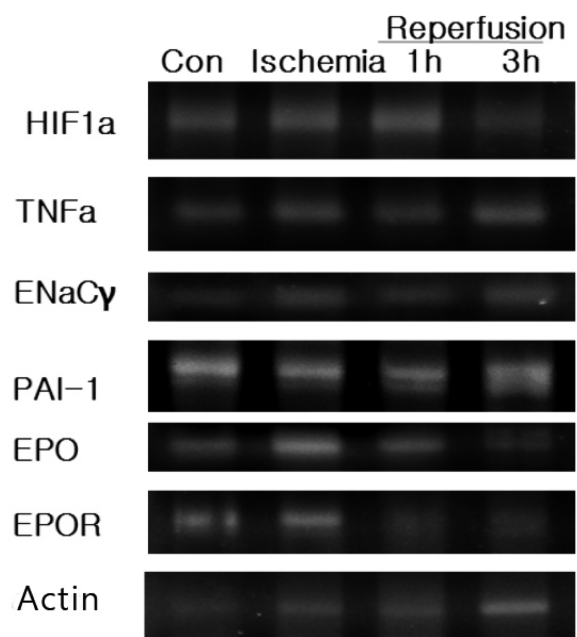


Fig 3. Renal gene expression during renal ischemia-reperfusion injury in miniature pigs.

도 역시 허혈-재관류 후 나타나는 전사인자(transcription factor)로 확인되었으므로 급성신부전에서 유용한 표지자로서의 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

HIF1은 HIF1 α 와 HIF1 β 로 구성된 이질이합체(heterodimer)로 저산소 적응반응을 유도하는 전사인자이며, erythropoietin, transferrin, tyrosine hydroxylase, VEGF, inducible nitric oxide synthase (iNOS), heme oxygenase, glucose transporter 1, lactate dehydrogenase A 그리고 혐기성 해당작용에 참여하는 여러 종의 효소들과 같은 저산소 적응 단백질 유전자의 공통 서열(5'-TACGTGCT-3')과 결합하여 이들 유전자들의 발현을 증가시킨다(11,14,27). HIF1 β 는 산소농도에 상관없이 존재하는 반면, HIF1 α 는 산소농도에 의해 그 존재가 결정된다. 따라서 저산소 적응반응의 조절하는 단백질은 HIF1 α 이라 할 수 있다. 정상 산소농도에서는 HIF1 α 에 ubiquitin이 결합하고 곧 이어 proteasome에 의해 이 단백질이 파괴되며, 저산소에서는 이러한 HIF1 α 의 파괴가 억제됨으로써 이 단백질이 증가한다(12). 또한 이전의 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 신허혈시에 HIF1 α 발현이 증가된다고 보고하였다(18). 이러한 결과는 본 연구에서도 허혈-재관류 후 western blotting을 통해 HIF1 α 의 의미있는 변화를 관찰할 수 있었다.

이상의 실험 결과에서 알 수 있듯이 renal gene 중에서 HIF1 α , EPO, EPOR이, renal protein 중에서 HIF1 α , NF κ B, I κ B, EPO, EPOR, Angiopoietin-1, VEGF에서 의미 있는 변화를 보였음을 알 수 있었다. 이를 토대로 급성신부전 진단에서 위와 같은 인자들이 예민한 표지자가 될 수 있으리라 생각된다. 또한 이후에 급성신부전이나 신장 이식 환자에서는 위 표지자들을 연구하여 임상적으로도 이용할 수 있는지에 대한 추가적인 연구가 더 필요하리라 생각된다.

결 론

신장의 허혈-재관류에 의한 급성 신손상에서 renal protein 중에서 HIF1 α , pNF κ B, pI κ B, pEPO receptor, angiopoietin-1, VEGF와 renal gene 중에서 HIF1 α , EPO, EPOR가 신손상 초기에 예민하게 증가되어 급성신부전의 초기 표지자로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업의 연구비(Code#20070401034006) 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 최민정, 박선희, 김찬덕, 김용립, 권태환, 김인산, 김용진. 허혈성 급성신부전에서 TGF- β -induced gene product β ig-h3의 변화와 초기 표지자로서의 의의. 대한신장학회 2007; 26: 301-310.
2. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal

- transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 1997; 336: 1066-1071.
3. 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-F509.
4. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2199-2210.
5. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. Science 1995; 267: 1485-1488.
6. Cooper JT, Stroka DM, Brostjan C, Palmethofer A, Bach FH, Ferran C. A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. J Biol Chem 1996; 271: 18068-18073.
7. Devaranjan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. Curr Opin Pediatr 2005; 17: 193-199.
8. Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, Chung CS, Abraham E, Harken AH. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. J Urol 2000; 163: 1328-1332.
9. 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: 851-858.
10. Grone HJ, Simon M, Grone EF. Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. J Pathol 1995; 177: 259-267.
11. Huang LE, Bunn HF. Regulation of erythropoietin gene expression. Curr Opin Hematol 1995; 2: 125-131.
12. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 7987-7992.
13. Humes HD, Liu S. Cellular and molecular basis of renal repair in acute renal failure. J Lab Clin Med 1994; 124: 749-754.
14. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1996; 271: 17771-17778.
15. Khankin EV, Mutter WP, Tamez H, Yuan HT, Karumanchi SA, Thadhani R. Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease. PLoS One 2010; 5: e9246.
16. Liu S, Humes HD. Cellular and molecular aspects of renal repair in acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens 1993; 2: 618-624.
17. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. Immunol Today 1998; 19: 80-88.
18. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 1721-1732.
19. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. Semin Nephrol 2003; 23: 511-521.
20. Sangidorj O, Yang SH, Jang HR, Lee JP, Cha RH, Kim SM, Lim CS, Kim YS. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells confer renal protection in a murine chronic renal failure model. Am J Physiol Renal Physiol 2010; 299: F325-F335.

21. Schena FP. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int* 1998; S66: S11-S15.
22. Srani SK, Chung B, Marks J, Pourvali K, Solanky N, Rapisarda C, Chaston TB, Hanif R, Unwin RJ, Debnam ES, Sharp PA. Erythropoietin regulates intestinal iron absorption in a rat model of chronic renal failure. *Kidney Int* 2010; 78: 660-667.
23. Steven GC, Chirag RP. Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury: Perspectives on Translation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 481-490.
24. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1448-1460.
25. Toback FG. Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 1992; 41: 226-246.
27. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, Bradwin G, Matsouaka R, Betensky RA, Curhan GC, Bonventre JV. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci* 2008; 1: 200-208.
28. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268: 21513-21518.
29. Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL. Has mortality from acute renal failure decreased A systematic review of the literature. *Am J Med* 2005; 118: 827-832.