

신장 이식 환자의 적혈구에서 산화적 손상*

계명대학교 의과대학 생화학교실

정상호 · 문교철

Oxidative Damage in Erythrocytes from Patients with Renal Transplant

Sang Ho Chung, M.D. and Kyo Cheol Mun, M.D.

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

=Abstract=

Patients with end stage renal failure display increased oxidative damage to red blood cell (RBC) membranes, characterized by elevated levels of malondialdehyde, a short chain aldehyde produced by the oxidation of the polyunsaturated fatty acids in the RBC membranes. This oxidative damage induces increased RBC rigidity and decreased RBC deformability, therefore favoring hemolysis in patients. The aim of this work was to determine whether renal graft would reduce the oxidative damage or not. Malondialdehyde and three well known antioxidant enzymes were measured in controls, and patients with renal graft or end stage renal disease. Malondialdehyde and glutathione peroxidase levels in patients with end stage renal disease were higher than those from healthy controls. Superoxide dismutase and catalase activities in patients with end stage renal disease were lower. These all parameters in the shortened (RBCs) from renal graft were normalized. These results indicate that a well-functioning renal graft restores the normal activities of antioxidant enzymes in RBCs, thus results in the elimination of the oxidative damage induced by uremia.

Key Words: Catalase, Glutathione peroxidase, Oxidative damage, Superoxide dismutase

* 이 논문은 계명대학교 대학원 학생 학술연구장학금에 의하여 이루어 졌음.

서 론

활성 산소 (free radical)는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자 (Moslen, 1994; PUNCHARD & Kelly, 1996)로 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임 없이 활성 산소를 생성한다 (Moslen, 1994; PUNCHARD & Kelly, 1996). 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못 한다. 활성 산소는 반응성이 높아 생체 분자들의 구조와 기능을 변화시켜 신체에 손상을 끼치며 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 작용한다 (Moslen, 1994; PUNCHARD & Kelly, 1996). 이러한 과잉의 통제되지 않는 활성 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥 경화 (Reaven, 1994), 심장 질환 (Fer-rari, 1994), 암 (Ames & Shigenaga, 1993) 및 노화 (Ames & Shigenaga, 1993) 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 활성산소는 신장 질환 및 신장 질환에서의 합병증에 관여하는 것 (Baud & Ardaillou, 1993; Nath *et al.*, 1994; Diamond, 1994)으로 알려져 있다.

한편, 말기신부전 환자에서는 혈액학적 장애가 항상 동반 (김현철과 박성배, 1997; Mak, 1996; Seyrek *et al.*, 1996; Boran *et al.*, 1996)되며 이러한 혈액 장애의 하나로 빈혈을 들 수 있다 (김현철 및 박성배, 1997; Mak, 1996; Seyrek *et al.*, 1996; Boran *et al.*, 1996). 말기신부전에서 빈혈의 원인은 erythropoietin의 생성 저하와 혈중 erythropoietin의 활성 저하 (Wallner & Vautrin, 1981; 김현철과 박성배, 1997; Morris & Coulthard, 1993), hypoproliferative bone

marrow, shortened erythrocytes (RBCs) survival times 및 활성 산소에 의한 적혈구 막의 산화적 손상을 들 수 있다 (Trznadel *et al.*, 1989; Toborek *et al.*, 1992 Eschbach & Adamson, 1991).

말기 신부전 환자의 적혈구는 산화적 손상에 노출되어 있으며 이로 인해 적혈구에서 산화적 손상의 지표인 malondialdehyde (Brown & Kelly, 1996)가 증가되어 되어 있는 것 (Mun, 1999)으로 알려져 있다. 이러한 현상은 활성 산소들을 처리하는 능력의 감소로 인해 초래되며, 이로 인해 적혈구 막의 강도를 저하 시키고 적혈구의 변형을 유발하여 말기 신부전 환자에서 빈혈을 유발하는 하나의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 연구에서는 신장 이식으로 이러한 산화적 손상이 감소되어 정상으로 회복될 수 있는지를 알아 보기 위하여 신장 이식 환자와 말기 신부전 환자 및 정상 대조군을 대상으로 이들의 적혈구에서 malondialdehyde 와 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 재료

34.5 ± 2.5 세의 신장 이식환자를 대상으로 하였으며, 말기 신부전 환자는 51.9 ± 10.2 세의 혈액 투석을 하는 14명의 환자를 대상으로 하였다. 정상 대조군은 신기능 및 신체 검사 소견상 정상 소견을 보인 13명으로 이들의 평균 나이는 43.3 ± 11.8 세였다. 환자군과 정상 대조군 모두에서 활성 산소에 영향을 미치는 vitamin C와 E를 최근 1개월 이내 사용한 경험이 있는 환자와, 최근 1개월

이내에 수혈을 받은 경험이 있는 환자는 실험군에서 제외하였다. 신장 이식의 평균 기간은 32.4 ± 7.5 였으며, 혈중 BUN 및 creatinine치는 각각 19.3 ± 1.3 및 1.5 ± 0.1 이었다. 말기 신부전 환자의 평균 투석 기간은 33.8 ± 12.6 개월이었으며 혈액투석은 polymethyl methacrylate dialyzer (FILTRYZER; Toray, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이들 말기 신부전 환자에서 혈중 BUN 및 creatinine치는 각각 78.0 ± 21.3 및 10.1 ± 3.6 mg/dl였다.

2. 방법

1) 시약

Tris(hydroxymethyl) aminomethane, reduced glutathione, glutathione reductase, dimethylsulfoxide, NADPH, thiobarbituric acid, cytochrome c, catalase 표품, glutathione peroxidase 표품, superoxide dismutase 표품 및 bovine albumin 등은 미국 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외 일반 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2) 측정방법

신장 이식환자와 정상 대조군은 정맥으로부터 통상적인 방법으로 채혈하였으며, 말기 신부전 환자들에서 혈액의 채취는 혈액 투석 전후에 동맥혈 line으로부터 하였으며 3,000 rpm으로 10분간 원심하여 혈장을 얻고 적혈구는 phosphate buffered saline으로 3회 세척한 후 차가운 중류수를 사용하여 용혈시킨 후 Drabkin's 시약을 첨가하여 hemoglobin을 cyanmethemoglobin으로 전환시킨 후 사용하였다.

적혈구에서 malondialdehyde양의 측정은 malondialdehyde가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법 (Buege & Aust, 1978)에 의하였다.

Superoxide dismutase의 활성도 측정은 alkaline dimethylsulfoxide를 superoxide anion-generating system으로 사용하여 cytochrome c의 환원되는 양을 측정하는 Hyland et al.의 방법 (1983)을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 cytochrome c가 50% 환원되는 양으로 하였다.

Glutathione peroxidase는 glutathione reductase를 glutathione의 환원 system으로 사용하여 glutathione peroxidase에 의해 glutathione이 산화될 때 소모되는 NADPH의 양으로 효소의 활성도를 측정하는 Palgia and Valentine의 방법 (1967)을 사용하였다.

Catalase의 활성도 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 사용하여 catalase에 의해 파괴되는 hydrogen peroxide양을 측정하는 Nelson & Kiesow의 방법 (1972)에 의하였다.

3) 통계처리

모든 값은 평균 ± 표준 편차로 나타내었고, 혈액 투석 전후의 비교는 Student's paired t-test를 하였고 정상인과 환자군의 비교는 Student's nonpaired t-test를 사용하였다.

결 과

Malondialdehyde의 양은 정상 대조군, 말기 신부전 환자 및 신장 이식 환자에서 각

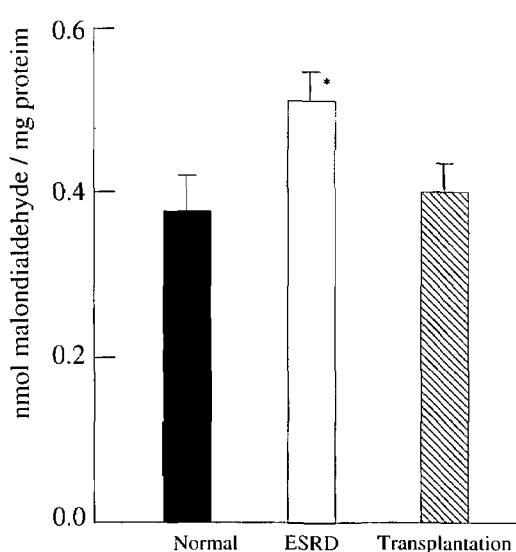


Fig.1. Malondialdehyde levels in erythrocytes. The data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from normal (*; $P<0.05$). ESRD; patients with end stage renal disease, Transplantation; patients with kidney transplantation

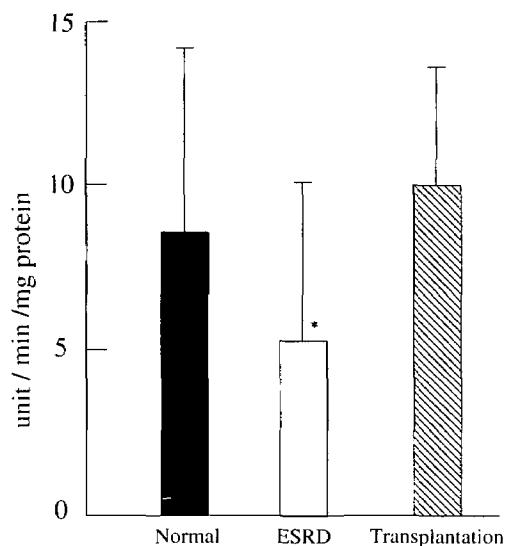


Fig.2. Superoxide dismutase activity. The data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from normal (*; $P<0.05$). ESRD; patients with end stage renal disease, Transplantation; patients with kidney transplantation

각 0.38 ± 0.03 , 0.52 ± 0.03 및 0.40 ± 0.03 nmol malondialdehyde/mg protein으로 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 증가를 보였으며 ($P<0.05$). 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 1).

Superoxide dismutase 활성도는 정상 대조군, 말기 신부전 환자 및 신장 이식 환자에서 각각 8.95 ± 5.20 , 5.41 ± 4.55 및 9.72 ± 3.92 unit/min/mg protein으로 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 감소를 보였으며 ($P<0.05$). 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 2).

Catalase 활성도는 정상 대조군, 말기 신부전 환자 및 신장 이식 환자에서 각각 31.31 ± 4.20 , 23.36 ± 1.75 및 $29.96 \pm$

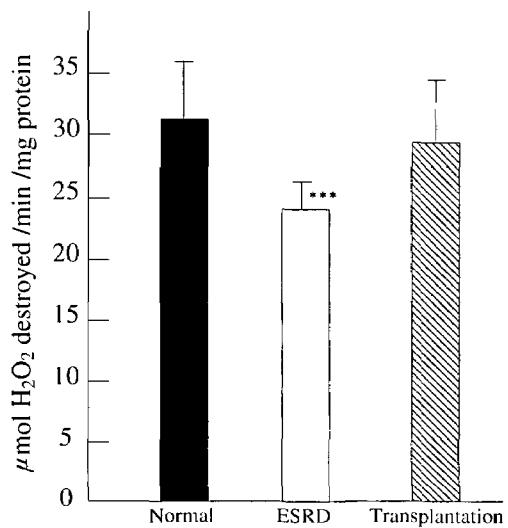


Fig.3. Catalase activity in erythrocytes. The data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from normal (**; $P<0.001$). ESRD; patients with end stage renal disease, Transplantation; patients with kidney transplantation

$5.25 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ destroyed}/\text{min/mg protein}$ 으로 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 감소를 보였으며 ($P<0.001$). 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 3).

Glutathione peroxidase 활성도는 정상 대조군, 말기 신부전 환자 및 신장 이식 환자에서 각각 17.33 ± 2.09 , 42.37 ± 7.86 및 $18.59 \pm 2.20 \text{ nmol NADPH oxidized}/\text{min/mg protein}$ 으로 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 증가를 보였으며 ($P<0.001$). 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 4).

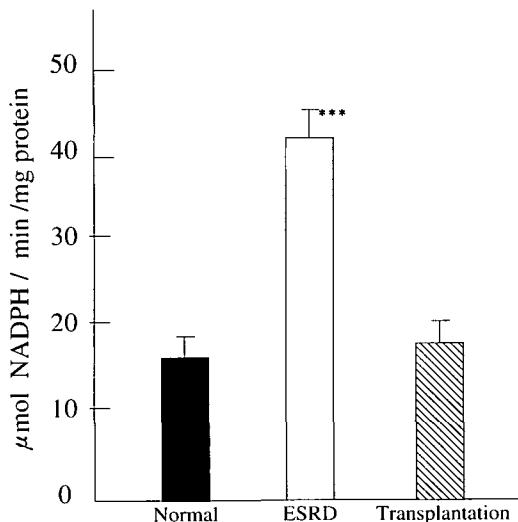


Fig. 4. Glutathione peroxidase activity. The data are expressed as mean \pm SD. Significant difference from normal (***; $P<0.001$). ESRD; patients with end stage renal disease, Transplantation; patients with kidney transplantation

고 찰

활성 산소 (free radical) 는 쌍을 이루지

않는 전자를 가진 분자 (Moslen, 1994; PUNCHARD & Kelly, 1996)로, 반응성이 높아 생체 분자들의 구조와 기능을 변화시켜 신체에 손상을 끼치며 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 작용한다 (Moslen, 1994; PUNCHARD & Kelly, 1996). 우리의 신체는 이러한 활성 산소가 가진 과잉의 손상에 너지를 유해하지 않은 물질로 전환시키거나 다른 분자들로부터 활성산소가 형성되는 것을 억제한다 (Halliwell & Gutteridge, 1989). 신체 내에는 여러 종류의 항산화제가 존재하지만 이중 가장 강력한 것은 항산화 효소계로서, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase가 있다 (Halliwell & Gutteridge, 1989). 이를 효소중 superoxide dismutase는 산소가 전자를 받아 생성되는 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 효소이다 (Halliwell & Gutteridge, 1989). 이 효소의 작용 후 생성되는 과산화 수소는 glutathione peroxidase나 catalase에 의해 인체에 무해하게 바뀌며 따라서 (Halliwell & Gutteridge, 1989) 활성산소의 제거는 이들 효소들의 작용으로 이루어 진다고 할 수 있다.

이 연구는 신장 이식으로 말기 신부전 때 보이는 적혈구의 이러한 산화적 손상이 감소되어 정상으로 회복될 수 있는지를 알아 보기 위하여 신장 이식 환자와 말기 신부전 환자 및 정상 대조군을 대상으로 이들의 적혈구에서 산화적 손상의 지표인 malondialdehyde (Brown & Kelly, 1996)와 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase를 측정하였다.

활성 산소에 의한 손상의 지표인 malondialdehyde의 양은 말기 신부전 환자에서

정상 대조군에 비해 의의있는 증가를 보였으며 ($P<0.05$), 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보여 활성 산소에 의한 손상이 신장 이식으로 감소되어 정상화되었다.

과산화 수소를 무독하게 분해하는 catalase의 활성도는 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 감소를 보였으며 ($P<0.05$), 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보였다. 과산화 수소를 분해하는 catalase의 활성도 저하는 과산화 수소 분해를 자연시켜 과산화 수소로 인한 조직 손상을 증가시킬 수 있다. Catalase의 활성도 저하는 눈의 백내장 형성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는 만큼, 말기 신부전 환자의 적혈구에서 catalase의 활성도 저하는 과산화 수소로 인한 적혈구 손상을 증가시킬 것으로 생각된다. 그러나 이 효소 활성도 역시 신장 이식으로 정상으로 환원되었으며 따라서 말기 신부전에서는 과산화 수소로 인한 산화적 손상이 줄어들 수 있을 것으로 생각된다.

환원형 glutathione을 기질로 사용하여 과산화 수소를 무독화 시키는 효소인 glutathione peroxidase 활성도는 말기 신부전 환자에서 정상 대조군에 비해 의의있는 증가를 보였으며 ($P<0.001$), 신장 이식 환자에서는 대조군과 비슷한 수치를 보이며 정상화되었다. 말기 신부전 환자에서 glutathione peroxidase의 활성도 증가는 다른 항산화 효소들의 활성도 저하에 따라 항상성을 유지하기 위한 현상이 아닌가 생각된다. 신장 이식 후 이 효소의 활성도가 정상으로 환원된 것은 다른 두 항산화 효소의 활성도가 정상화됨으로써 이 효소 활성도 역시 정상으로 환원된 것이 아닌가 생각된다.

따라서 신장 이식은 적혈구내의 모든 항산화 효소들의 활성도를 정상화시킴으로써 말

기 신부전 환자에서 나타나는 활성 산소에 의한 손상을 제거하는 것으로 생각된다.

요 약

말기 신부전 환자들에서 일어나는 산화적 손상이 신장 이식으로 감소되어 정상으로 회복될 수 있는지를 알아보기 위하여 이 연구를 수행하였다. 신장 이식 환자와 말기 신부전 환자 및 정상 대조군을 대상으로 이들의 적혈구에서 malondialdehyde와 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase를 측정하였다. 말기 신부전 환자의 적혈구에서 malondialdehyde 농도와 glutathione peroxidase의 활성도는 정상인에 비해 증가되었으며, superoxide dismutase와 catalase 활성도는 정상인에 비해 감소를 보였다. 신장 이식 환자에서 모든 수치들이 정상화되었다. 따라서 신장 이식은 적혈구내의 모든 항산화 효소들의 활성을 정상화시킴으로써 말기 신부전 환자에서 나타난 활성 산소에 의한 손상이 제거되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 김현철, 박성배: 만성신부전. 김현철, 박성 배: 임상신장학. 대구, 계명대학교 출판부, 1997, pp195-220.
 Ames BN, Shigenaga MK: Oxidants are a major contributor to cancer and aging.
 Halliwell B, Aruoma: DNA and free radicals. New York, Ellis Horwood, 1993, pp.1-15.
 Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage.

- British Medical Bulletin* 1993;49(3):621-629.
- Boran M, Dalva I, Gonenc F, Cetin S: Response to recombinant human erythropoietin (r-Hu EPO) and Lcarnitine combination in patients with anemia of end-stage renal disease. *Nephron* 1996;73(2):314-315.
- Brown RK, Kelly FJ: Peroxides and other products. Puchard NA, Kelly FJ: *Free radicals. A practical approach*. Oxford, Oxford University Press, 1996, pp. 119-131.
- Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. Colowick SP, Kaplan NO: *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1978, Vol 52, pp 302-310.
- Diamond JR: Reactive oxygen species and progressive glomerular disease. *J Lab Clin Med* 1994;124:(4)468-469.
- Eschbach JW, Adamson JW: Hematologic consequences of renal failure. Brenner BM, Rector FC Jr: *The Kidney*. 4th ed. Philadelphia, Harcourt Brace Jovanovich, 1991, pp. 2019-2035.
- Ferrari R: Oxygen free radicals at myocardial level: Effect of ischemia and reperfusion. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press, 1994, pp. 99-112.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989, pp. 86-187.
- Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C: Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generation system. *Anal Biochem* 1983;135(2):280-287.
- Mak RH: Correction of anemia by erythropoietin reverses insulin resistance and hyperinsulinemia in uremia. *Am J Physiol* 1996; 270:(5pt2)F839-844.
- Morris K, Coulthard M: End-stage kidneys are capable of increased erythropoietin production. *Pedia Nephrol* 1993;7(3):273-275.
- Moslen MT: Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York:Plenum Press, 1994,pp. 17- 27.
- Mun KC, Joo I, Kim YH, Park SB, Kim HC: Effect of hemodialysis on levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes in erythrocytes from patients with end stage renal disease. *Korean J Nephrol* 1998;17(4):591-596.
- Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH: The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 1994;45 (Suppl. 45):S111-S115.
- Nelson DP, Kiesow LA: Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;49(2):474-478.
- Paglia ED, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-169.
- Puchard NA, Kelly FJ: Introduction.

- Punchard NA, Kelly FJ: *Free radicals. A practical approach.* Oxford, Oxford University Press, 1996, pp. 1-8.
- Reaven PD: Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy.* New York, Plenum Press, 1994, pp. 113-128.
- Seyrek N, Paydas S, Sagliker Y: Improvement of anemia and secondary hyperparathyroidism with erythropoietin treatment in hemodialysis patients. *Nephron* 1996;73(2): 338-339.
- Toborek M, Wasik T, Drozdz M, Klin M, Magner-Wrobel K, Kopieczna-Grzebieniak E: Effect of he-modialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism* 1992; 41(11):1229-1232.
- Trznadel K, Pawlicki L, Kedziora J, Luciak, M, Blaszczyk J, Buczynski A: Superoxide anion generation, erythrocytes superoxide dismutase activity, and lipid peroxidation during hemoperfusion and hemodialysis in chronic uremic patients. *Free Radic Biol Med* 1989;6(4):393-397.
- Wallner SF, Vautrin RM: Evidence that inhibition of erythropoiesis is important in the anemia of chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 1981;97(2):170-178.