

## 말기 신부전 환자의 중성구에서 활성 산소 대사

계명대학교 신장연구소, 만성질환 예방 및 치료화학제 연구센터

최혜정 · 권진경 · 문교철 · 장은주 · 곽춘식 · 한승엽 · 황은아 · 박성배 · 김현철

### 〈요약〉

**목적:** 말기 신부전 환자에서는 감염에 대항하는 중성구의 기능장애 기전을 밝히고자 하였다.

**방법:** 혈액투석을 하는 말기 신부전 환자 50명과 정상인 40명에서 중성구를 분리한 후 superoxide 음이온, 과산화수소의 농도 및 malondialdehyde 농도, 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 및 myeloperoxidase의 농도를 측정하였으며, SOD의 조효소인 구리와 아연 이온의 농도를 측정하고, SOD에 대한 역전사 중합효소 연쇄 반응을 실시하였다.

**결과:** 말기 신부전 환자의 중성구에서는 정상인에 비해 superoxide 음이온, catalase, glutathione peroxidase, malondialdehyde가 증가하였으며, SOD, 과산화 수소의 양, 아연 이온의 농도는 감소하였다. 또한 말기 신부전 환자에서는 SOD의 유전자 발현이 억제되었으며 glutathione peroxidase의 활성을 유의한 변동이 없었다.

**결론:** 말기 신부전 환자의 중성구에서는 유전자 발현 억제 및 조효소의 양적 감소에 의해 SOD의 활성이 저하되며, 이로 인한 superoxide 음이온의 증가는 중성구의 산화적 손상을 유발하는 것으로 생각된다. 또한 SOD의 활성 저하와 catalase의 활성 증가는 과산화 수소를 감소시켜 myeloperoxidase에 의해 전환되는 차아염소산의 감소를 초래함으로서 중성구 기능 장애 원인 중의 일부로 작용할 수 있음을 시사한다.

### 서 론

말기 신부전은 비가역적인 신기능 악화로 인해 신장 이식을 받거나 아니면 평생 혈액투석 혹은 복막투석과 같은 신대체 요법을 받아야 하는 질환이다. 말기 신부전 환자의 주요 사망 원인은 감염과 심근 경색 및 뇌졸중 등의 심혈관계 질환으로<sup>1-5)</sup>, 특히 감염은 그 정도가 정상인보다 높은 것으로 보고되고 있다<sup>1, 2, 6)</sup>. 이를 환자에서의 감염은 중성구의 생성은 정상이나 중성구의 기능 장애에 의한 것<sup>7-10)</sup>으로 알려져 있으나 그의 정확한 기전은 분명하지 않다.

본 연구는 한국과학재단 기초의학 연구센터 사업지원으로 수행되었음 (R13-2002-028-01003-0 (2002)).

접수: 2003년 7월 28일, 승인: 2004년 1월 29일

책임저자: 문교철 대구광역시 중구 동산동 194

계명대학교 의과대학 생화학교실

Tel : 053)250-7786, Fax : 053)252-1605

E-mail : mun@dsmc.or.kr

건강 정상인에서 중성구가 탐식 작용을 하게 되면 활성 산소 (oxygen free radical)가 다양 생성된다<sup>11)</sup>. 산소가 전자를 받아 superoxide 음이온이 되면 이는 superoxide dismutase에 의해 과산화 수소로 전환된다<sup>11-13)</sup>. 과산화 수소는 glutathione peroxidase나 catalase에 의해 인체에 무해한 물로 바뀌게 되며<sup>11-13)</sup>, 이때 glutathione peroxidase는 환원형 glutathione을 필요로 하지만, catalase는 별도의 기질이 필요 없이 과산화 수소를 바로 분해한다. 또한 과산화 수소는 myeloperoxidase의 작용으로 차아염소산으로 전환되어 강력한 살균력을 발휘하거나, 별도의 효소 작용 없이 금속 이온의 작용으로 Fenton 반응을 거쳐 수산화 radical이 되기도 한다<sup>11-13)</sup>.

그러나 말기 신부전 환자의 중성구에서 활성 산소의 생성과 이로 인한 손상 및 방어 효소들의 변동에 대하여는 아직 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 말기 신부전 환자의 중성구의 기능 장애 중에서도 활

성 산소 대사에 상당한 변화가 존재하리라 예상되어, 말기 신부전 환자의 중성구에서 활성 산소의 생성과 이로 인한 손상 및 방어 효소들의 변동을 밝힘으로써 말기 신부전 환자가 감염 질환에 대한 감수성이 높은 이유의 일단을 밝히고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

정상 대조군 (제 1군)은 신기능 및 신체 검사상 정상 소견을 보인 40명으로 이들의 평균 나이는  $42 \pm 16$  세였으며 남자가 24명, 여자가 16명이었다. 실험은 혈액투석 치료를 받고 있는 말기 신부전 환자 50명을 대상으로 하였다. 평균 나이는  $52.1 \pm 14.0$  세였으며 남자가 28명, 여자가 22명이었다. 혈액투석 전, 말기 신부전 환자들의 BUN 치는  $89.9 \pm 24.0$  mg/dL, 혈청 creatinine 치는  $9.50 \pm 1.82$  mg/dL, 백혈구 치는  $5.34 \pm 1.47 (\times 10^3)/\mu\text{L}$ , 적혈구 치는  $2.96 \pm 0.42 (\times 10^6)/\mu\text{L}$ , 혈색소 치는  $9.76 \pm 1.32$  mg/dL, 적혈구 용적률 치는  $28.87 \pm 3.89\%$ 이었다 (Table 1). 혈액투석 전을 제 2 군, 혈액투석 후를 제 3군으로 하였다. 환자군과 정상 대조군 모두에서 활성 산소에 영향을 미치는 비타민 C와 E를 최근 1개월 이내 사용한 경험이 있거나 최근 1개월 이내에 수혈을 받은 경험이 있는 경우는 대상에서 제외하였다. 검체의 제한된 양으로 인하여 측정 검체는 정상 대조군이 12명, 신부전 환자군이 14명이 되도록 조절하였으며, myeloperoxidase의 측정은 정상 대조군 40명, 신부전 환자군 42명이 되도록

하였다. 혈액투석 시 polymethyl methacrylate (Filterizer, Toray, Tokyo, Japan) 재질의 투석막을 사용하였다.

### 2. 검체채취 및 중성구의 분리

말기 신부전 환자에서 중성구의 분리는 Clark과 Nauseef<sup>14)</sup>의 방법에 의하였다. 즉, 혈액투석 전후에 동맥혈 라인으로부터 채취한 혈액은 헤파린이 함유된 시험관에 담고 잘 혼합하였다. 3% dextran T-500을 함유한 생리식염수액과 동량 혼합하고 20분간 실온에서 방치한 후 얻은 상층액을 취하여  $250 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 0.2% NaCl 용액 20 mL를 저장성 용혈을 시켰다. 30초 후 동량의 1.8% NaCl 용액을 가하여 등장 용액이 되도록 하였다. 이 과정을 반복하여 적혈구를 완전히 제거한 후, 중성구 숫자를 현미경하에서 계산한 다음 각종 실험의 자료로 사용하였다. 중성구 분리의 모든 조작은 4°C에서 수행하였다.

### 3. Superoxide 음이온의 생성량

Superoxide 음이온의 양은 Yen과 Guernsey<sup>15)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 1 mL에  $6 \times 10^6$  개의 중성구와 phorbol myristate acetate 0.2 µg, 0.2% nitroblue tetrazolium (NBT)이 함유된 액을 37°C에서 30분간 배양하고 최종 농도가 1 mol/L가 되도록 염산 액을 가하여 반응을 중단시켰다. 측정 대조군 (blank test)은 30분 배양 없이 바로 염산액을 가하여 반응을 중단시켰다. 반응을 중단시킨 후 1시간 동안 실온에 방치하고 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 얻은 침전물을 1 mL의 dimethylsulfoxide에 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide 음이온 생성량은 Auclair와 Voisin<sup>16)</sup>의 방법에 따라 분자흡광계수  $15,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 계산하였다.

### 4. 과산화 수소 양

과산화 수소의 측정은 ferrous 이온이 산성 조건에서 과산화 수소에 ferric 이온이 된 후 xylenol orange 와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange hydrogen peroxide 측정법<sup>17)</sup>을 사용하여 측정하였다.

Table 1. Characteristics of Patients with End-Stage Renal Disease

Parameters	Levels
Number of patients	50
Age (years)	$52.1 \pm 14.0$
Male : Female	28 : 22
BUN (mg/dL)	$89.9 \pm 24.0$
Creatinine (mg/dL)	$9.50 \pm 1.82$
WBC counts ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$5.34 \pm 1.47$
RBC counts ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	$2.96 \pm 0.42$
Hemoglobin levels (mg/dL)	$9.76 \pm 1.32$

BUN : blood urea nitrogen.

Blood was obtained from patient with end-stage renal disease before hemodialysis

## 5. 항산화 효소들의 활성

Superoxide dismutase 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 NBT를 환원시키는 양을 측정하는 Sun 등<sup>18)</sup>의 방법을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소 액을 넣지 않는 반응액 중의 NBT의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

Catalase 활성도의 측정은 과산화 수소를 기질로 사용하여 25°C에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 과산화 수소가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow<sup>19)</sup>의 방법을 사용하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 과산화 수소를  $\mu\text{mol}$ 로 나타내었다.

Glutathione peroxidase의 활성도 측정은 환원형 glutathione, 과산화 수소 및 NADPH를 기질로 사용하고 glutathione reductase를 촉매로 하여 중성구 시료액과 함께 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 환원형 glutathione이 과산화 수소에 의해 산화형 glutathione으로 된다. 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione으로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340 nm 파장에서 time scan을 하여 NADPH의 분자흡광계수 ( $E_{340 \text{ nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 효소의 활성도를 산출하는 Paglia와 Valentine<sup>20)</sup>의 법을 사용하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성된 NADP<sup>+</sup> 양을 nmol로 나타내었다.

## 6. Myeloperoxidase의 농도

Myeloperoxidase의 농도는 sandwich ELISA 방법을 사용하는 Bioxytech MPO-EIA kit (OXIS international Inc., Portland, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. 즉, biotin-labeled goat polyclonal anti-myeloperoxidase, avidin alkaline phosphatase conjugate 및 p-nitrophenyl phosphate를 사용하여 생성되는 p-nitrophenol을 405 nm에서 정량하였다. 단위는 myeloperoxidase에 대한 표준 검량 곡선을 작성한 후 시료 mL당 함유된 myeloperoxidase 양을 ng으로 나타내었다.

## 7. 구리와 아연 이온 농도

구리 이온과 아연 이온의 농도는 electrothermal atomic absorption법을 사용하여 Varian GTA-97과 SpectrAA-250 Plus (Varian, Melbourne, Australia)로 측정하였다.

## 8. Malondialdehyde 농도

Malondialdehyde 농도의 측정은 thiobarbituric acid assay 방법<sup>21)</sup>을 사용하였다. 즉, 시료를 0.25 N 염산에 0.375%의 thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100°C 수용액 중에서 15분간 방치한 후 3,000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 535 nm에서 측정하였다. 시료 중 malondialdehyde 농도는 분자흡광계수  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 사용하여 계산하였다.

## 9. RNA의 추출 및 역전사 중합효소 연쇄반응

분리한 중성구에서 RNAZOL-B 용액 (Bioteck Laboratory, Houston, TX, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 전체 RNA에 oligo d(T)16, 10× buffer II, MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20 U/ $\mu\text{L}$  RNase inhibitor, 50 U/ $\mu\text{L}$  역전사 중합효소 (Roche Molecular System, Basel, Swiss)를 첨가하여 최종 20  $\mu\text{L}$ 가 되게 넣은 다음, 42°C에서 1 시간 동안 반응시키고 99°C에서 5분간 열 변성하여 cDNA 합성반응을 종료하였다.

사람의 Cu/Zn superoxide dismutase를 지시하는 mRNA에 대한 염기 서열을 확인한 후 superoxide dismutase의 sense 시발체는 5'-TAGCGAGTTA-TGGCGACGAA-3'과 antisense 시발체로는 5'-AC-GACTTCCAGCGTTTCCTG-3' (주식회사 바이오니아, 충북 청원군, 한국)를 이용하였다. 대조군으로 사용한 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 sense 시발체는 5'-CGTCTTCACCA-CCATGGAGA-3'과 antisense 시발체로 5'-CGGC-CATCACGCCACAGTTT-3' (주식회사 바이오니아, 충북 청원군, 한국)를 이용하였다.

중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3  $\mu\text{L}$ 에 10× buffer II, MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 시발체, 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq polymerase, 역전사 반응물을 첨가하여 최종 20  $\mu\text{L}$ 가 되게 하였다. DNA 증폭은 94°C에서 5분, 94°C

에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분간을 총 28회 시행한 후 72°C에서 5분간 연장 반응을 추가하였고 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각 441, 300 base pair의 띠를 확인하였다.

Superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 정도는 Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System (Bio-Rad사, Hercules, CA, USA)에서 읽은 superoxide dismutase에 대한 강도를 각각의 GAPDH 강도로 나누어 relative index를 구하여 계산하였다.

## 10. 성적 검정

자료는 평균±표준오차로 표시하고, 대조군과 실험군 사이의 비교는 Student's t-test로 하였으며 실험군 중 혈액투석 전후의 비교는 paired t-test를 하였다. 통계학적 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

## 결 과

### 1. 종성구에서 superoxide 생성량

정상군인 제 1군에서 superoxide 음이온의 생성량은  $1.72 \pm 0.45$  nmol NBT/min/ $10^7$  cells였으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $8.10 \pm 1.89$  nmol NBT/min/ $10^7$  cells로 제 1군에 비해 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $7.73 \pm 0.77$  nmol NBT/min/ $10^7$  cells로 제 1군에 비해서는 유의하게 증가하였으나 ( $p < 0.01$ ), 제 2군에 비해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 1).

### 2. 종성구에서 superoxide dismutase의 활성

정상군인 제 1군에서 superoxide dismutase의 활성은  $2.40 \pm 0.46$  unit/min/ $10^7$  cells였으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $1.22 \pm 0.21$  unit/min/ $10^7$  cells로 제 1군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $1.17 \pm 0.21$  unit/min/ $10^7$  cells로 제 1군에 비해서는 유의하게 감소하였으나 ( $p < 0.05$ ), 제 2군에 비해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 2).

### 3. 종성구에서 과산화 수소양

정상군인 제 1군에서 과산화 수소의 농도는  $1.93 \pm 0.25$  nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ $10^6$  cells였으며, 혈액투석 직전에 채

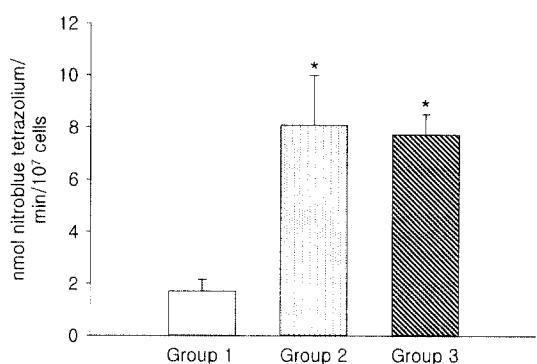


Fig. 1. Superoxide anion production in neutrophils. Group 1 : healthy control group; Group 2 : blood was drawn just before hemodialysis; Group 3 : blood was drawn just after hemodialysis. \* $p < 0.01$  vs. group 1.

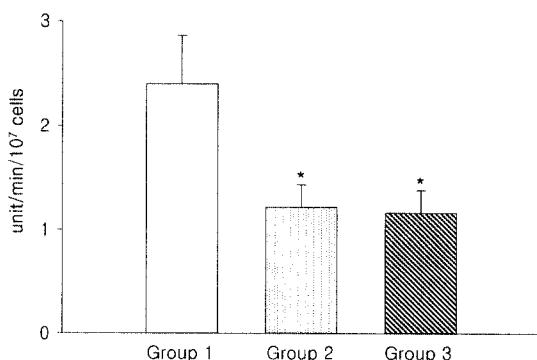
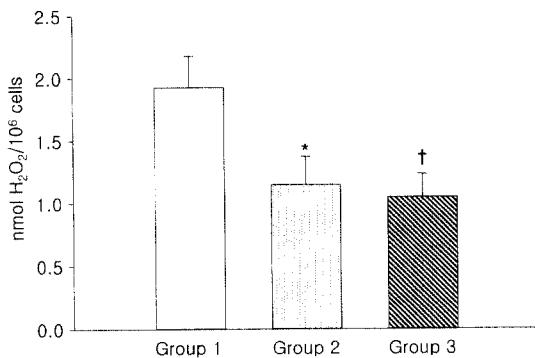


Fig. 2. Superoxide dismutase activity in neutrophils. Group 1 : healthy control group; Group 2 : blood was drawn just before hemodialysis; Group 3 : blood was drawn just after hemodialysis. unit : 50% inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. \* $p < 0.05$  vs. group 1.

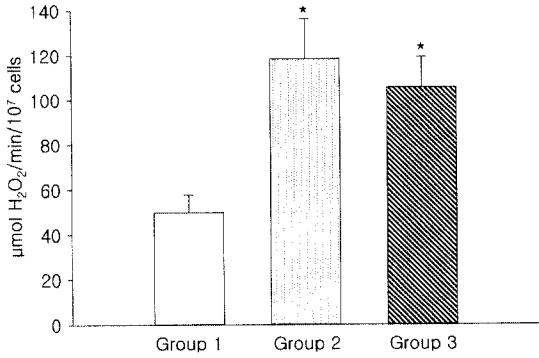
혈한 제 2군에서는  $1.15 \pm 0.22$  nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ $10^6$  cells로 제 1군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $1.05 \pm 0.18$  nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ $10^6$  cells로 제 1군에 비해서는 유의하게 감소하였으나 ( $p < 0.01$ ), 제 2군에 비해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 3).

### 4. 혈장에서 myeloperoxidase의 농도

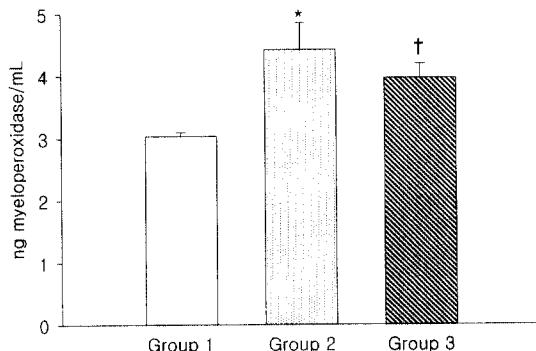
정상군인 제 1군에서 myeloperoxidase의 농도는  $3.04 \pm 0.06$  ng/mL이었으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $4.43 \pm 0.42$  ng/mL로 제 1군에 비해 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 혈액투석 직후에 채혈한



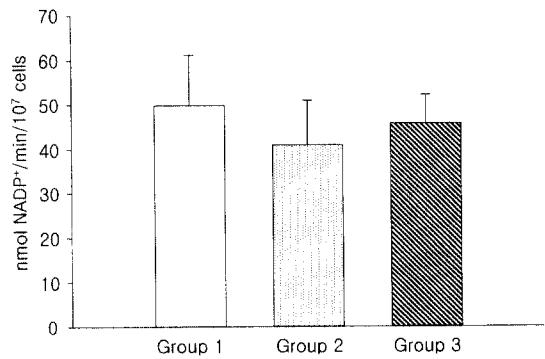
**Fig. 3.** Hydrogen peroxide levels in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis. \* $p<0.05$  vs. group 1; † $p<0.01$  vs. group 1.



**Fig. 5.** Catalase activity in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis. \* $p<0.01$  vs. group 1.



**Fig. 4.** Myeloperoxidase levels in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis. \* $p<0.01$  vs. group 1; † $p<0.001$  vs. group 1.



**Fig. 6.** Glutathione peroxidase activity in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis. 1 and text.

제 3군에서는  $3.97 \pm 0.23$  ng/mL로 제 1군에 비해서는 유의하게 증가하였으나 ( $p<0.001$ ), 제 2군에 비해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 4).

##### 5. 중성구에서 catalase의 활성

정상군인 제 1군에서 catalase의 활성은  $49.75 \pm 7.90 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 였으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $118.46 \pm 17.75 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 로 제 1군에 비해 유의하게 증가하였다 ( $p<0.01$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $105.56 \pm 13.70 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 로 제 1군에 비해서는 유의하게 증가하였으나 ( $p<0.01$ ), 제 2군에

비해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 5).

##### 6. 중성구에서 glutathione peroxidase의 활성도

정상군인 제 1군에서 glutathione peroxidase의 활성은  $49.92 \pm 11.23 \text{ nmol NADP}^+/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 였으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $40.97 \pm 9.96 \text{ nmol NADP}^+/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 이었고, 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $45.82 \pm 6.31 \text{ nmol NADP}^+/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 로 각 군간에 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 6).

## 7. 중성구에서 구리 이온의 농도

정상군인 제 1군에서 구리 이온의 농도는  $0.13 \pm 0.02 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 이었으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $0.10 \pm 0.01 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 이었으며, 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $0.10 \pm 0.03 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 로 각 군간에 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 7).

## 8. 중성구에서 아연 이온의 농도

정상군인 제 1군에서 아연 이온의 농도는  $1.51 \pm 0.21 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 이었으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $1.07 \pm 0.11 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 로 제 1군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $1.22 \pm 0.16 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$ 로 제

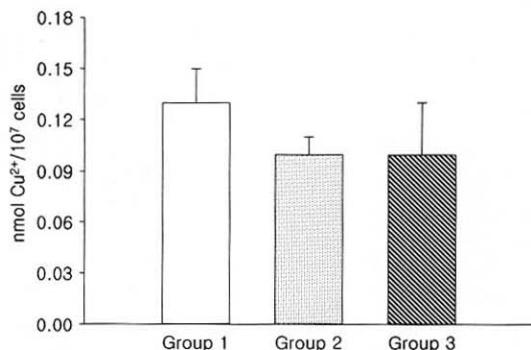


Fig. 7. Copper levels in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis.

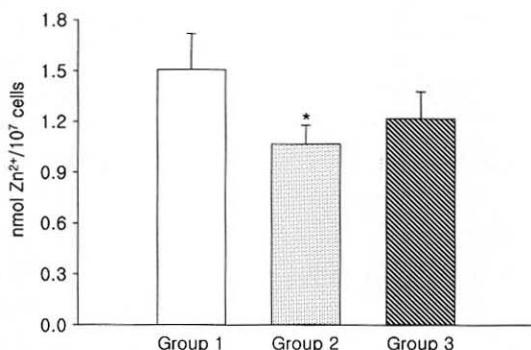


Fig. 8. Zinc levels in neutrophils. Group 1: healthy control group; Group 2: blood was drawn just before hemodialysis; Group 3: blood was drawn just after hemodialysis.

1군 및 제 2군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 8).

## 9. Superoxide dismutase/GAPDH의 mRNA 발현 정도

Superoxide dismutase에 대한 relative index를 비교했을 때 정상군인 제 1군에서는  $1.92 \pm 0.27$ 이었으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $1.22 \pm 0.05$ 로 제 1군에 비해 유의한 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는 superoxide dismutase의 활성이 제 2군과 별다른 변화가 없었음으로 이에 대한 조사는 수행하지 않았다 (Fig. 9).

## 10. 중성구에서 malondialdehyde의 농도

정상군인 제 1군에서 malondialdehyde의 농도는  $46.23 \pm 8.99 \text{ nmol malondialdehyde}/10^7 \text{ cells}$ 이었으며, 혈액투석 직전에 채혈한 제 2군에서는  $78.00 \pm 7.25 \text{ nmol malondialdehyde}/10^7 \text{ cells}$ 로 제 1군에 비해 유

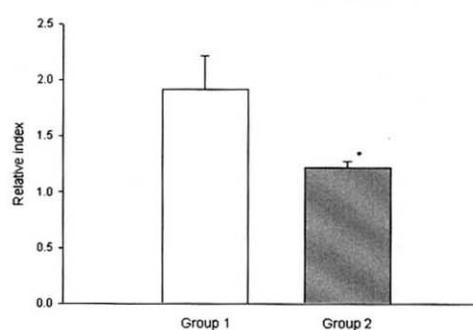
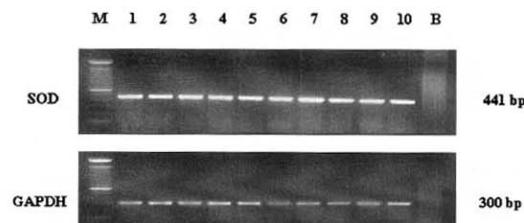
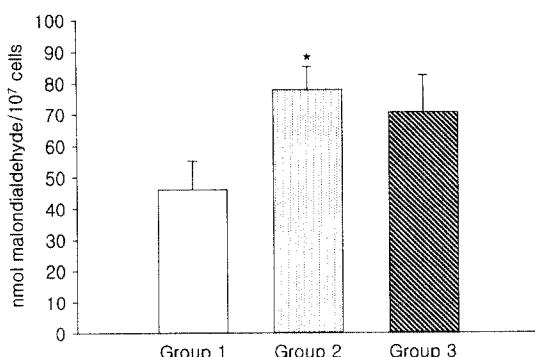


Fig. 9. mRNA expression for superoxide dismutase in neutrophils. Relative index was defined as the ratio between SOD and GAPDH. M: size marker; 1 to 5: blood was drawn just before hemodialysis (Group 2); 6 to 10: neutrophils from healthy human beings (Group 1); B: blank; SOD: superoxide dismutase; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.  $p < 0.05$  vs. group 1.



**Fig. 10.** Malondialdehyde levels in neutrophils. Group 1 : healthy control group; Group 2 : blood was drawn just before hemodialysis; Group 3 : blood was drawn just after hemodialysis. \* $p<0.05$  vs. group 1.

의하게 증가하였다 ( $p<0.05$ ). 혈액투석 직후에 채혈한 제 3군에서는  $70.66 \pm 11.66$  nmol malondialdehyde/ $10^7$  cells로 제 1군 및 제 2군에 비해 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 10).

## 고 칠

활성 산소는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자이며, 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성 산소를 생성한다<sup>22, 23</sup>. 이들 없이는 에너지를 생성하지도, 감염 원에 대응하지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 그러나 과잉의 통제되지 않는 활성 산소는 세포에 손상을 주며 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 이러한 유해 산소는 염증 반응<sup>24</sup>에 관여하며 유해 산소에 의한 세포에 손상 작용이 축적되어 심장 질환<sup>25</sup>, 암<sup>26</sup>, 노화<sup>27</sup> 및 신장질환<sup>28</sup> 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 활성 산소의 생성과 소멸은 세포내의 항산화계에 의해 평형을 유지하고 있다.

정상인의 중성구에서 세포질내의 superoxide는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase에 의해 대사되며, 그 과정 중 생성된 과산화수소는 myeloperoxidase에 의해 살균 작용에 중요한 역할을 하는 차아염소산으로 전환되는 것으로 알려져 있다<sup>11-13</sup>. 그리고 중성구의 정상적인 기능에 중요한 역할을 하는 활성 산소는 중성구가 탐식 작용을 하게 되면 다량 생성<sup>11</sup>된다고 한다. 말기 신부전 환자에서

는 감염에 대항하는 중성구의 생성은 정상이나 기능 장애가 있는 것<sup>7-10</sup>으로 알려져 있을 뿐, 기능 장애의 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 말기 신부전 환자의 중성구에서 활성 산소의 대사에 이상이 있을 것으로 추정된다.

본 연구결과, 말기 신부전 환자의 중성구에서 superoxide 음이온은 증가 (Fig. 1)하였으나 superoxide 음이온을 superoxide dismutase의 활성은 감소하였다 (Fig. 2). Superoxide dismutase의 활성 감소의 원인을 알아보기 위해서 superoxide dismutase의 조효소로 알려진 구리와 아연 이온의 농도에 있어서, 구리 이온의 농도는 유의한 변화가 없었으나 아연 이온의 농도는 혈액투석 전에 감소되었다 (Fig. 7, 8). 그러나 혈액투석 후에는 아연 이온의 농도가 superoxide dismutase의 활성과는 다른 양상을 나타내었다 (Fig. 8). 이들 금속 이온들이 superoxide dismutase의 활성에 큰 영향을 미치지는 않지만 그 중에서도 아연 이온은 약간의 영향을 미치는 것을 나타내는 것이라 추정된다. 그리고 혈액투석 환자의 혈장에서 구리와 아연 이온 농도가 증가<sup>29</sup>되며, 말기 신부전 환자의 적혈구 막은 각종 이온의 이동에 대한 이상이 있을<sup>30</sup> 뿐만 아니라 중성구 막도 일부 이온 이동에 대한 기능 이상이 있는 것<sup>31</sup>으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구에서 중성구의 구리와 아연 이온의 농도 변화가 혈 중의 변화 양상과 다른 것은 말기 신부전 환자에서 이들 이온의 이동에 이상이 있기 때문이라 생각된다. 또한 superoxide dismutase에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과, superoxide dismutase에 대한 유전자 발현은 감소하였다 (Fig. 9). 서 등<sup>32</sup>의 연구에 의하면 superoxide dismutase의 활성은 요소에서 유래된 시안산에 의해 그 활성이 감소된다고 알려져 있다. 따라서 중성구에서 superoxide dismutase의 활성 저하는 superoxide dismutase에 대한 유전자 발현의 감소와 요소의 영향 및 아연과 같은 조효소의 영향을 받아 그 활성이 감소된 것으로 생각된다.

Ichikawa 등<sup>33</sup>에 따르면 superoxide dismutase의 활성 감소는 superoxide의 양적 증가를 유발하여 활성 산소에 의한 손상을 증가시킨다고 한다. 본 연구에서도 superoxide dismutase의 활성 저하, superoxide 음이온의 증가 및 활성 산소에 의한 손상의 지표인 malondialdehyde의 증가가 있었다. 이는 superoxide

dismutase의 활성 저하 및 superoxide 음이온의 생성 증가로 중성구가 손상되어 malondialdehyde가 증가된 결과라 생각된다.

그리고 과산화 수소를 처리하는 효소 중에서 glutathione peroxidase 활성의 유의한 변화는 없었으나, catalase 및 myeloperoxidase는 말기 신부전 환자에서 증가하였으며, 특히 myeloperoxidase의 활성이 증가했다는 Drueke 등<sup>34)</sup>의 연구 결과와도 일치되었다. 또한 말기 신부전 환자에서 과산화 수소의 생성량이 감소를 보였는데, 과산화 수소의 생성 저하는 superoxide dismutase의 활성 저하와 catalase의 활성 증가 및 myeloperoxidase의 증가에 기인한 것으로 생각된다. 즉, 과산화 수소 공급 효소의 활성 저하로 생성이 저하된 상태에서 과산화 수소 분해 효소의 활성 증가는 중성구에서 과산화 수소의 결핍을 초래한 것이라 생각된다. 말기 신부전 환자에서 감염에 대항하는 중성구의 생성은 정상이나 기능장애가 있는 것으로 알려져 있으나 기능 장애의 기전은 잘 알려져 있지 않다. 그리고 Murray<sup>11)</sup>에 의하면 중성구에서 활성 산소 중 세균에 대한 살균 작용에 가장 중요한 역할을 하는 것이 과산화 수소와 차아염소산인데, 본 연구 결과 과산화 수소의 양은 감소되어 있었으며 또한 비록 myeloperoxidase가 증가되어 있다하더라도 이 효소의 기질인 과산화 수소의 결핍으로 차아염소산의 양이 감소될 것으로 추론된다. 따라서 이는 세균에 대한 중성구의 기능 장애를 초래하는 일부 원인이 될 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 보아 말기 신부전 환자의 중성구에서는 유전자 발현 저하 및 조효소의 농도 저하 등에 기인된 superoxide dismutase의 활성 저하가 있었고 superoxide 음이온, 산화적 손상, catalase의 활성 및 myeloperoxidase의 증가가 있었으며 과산화 수소의 양적 감소가 있었다. 따라서 말기 신부전 환자의 중성구에서는 세균에 대하여 살균 작용을 나타내는 강력한 활성 산소가 결핍되어 있으며 이는 중성구의 기능 장애의 일부 원인이라 추정된다.

= Abstract =

**Metabolism of Reactive Oxygen Species in Neutrophils from Patients with End-Stage Renal Disease**

Hye-Jung Choi, M.S., Jin-Kyung Kwon, M.D.  
Kyo-Cheol Mun, M.D., Eun-Ju Chang, Ph.D.  
Chun-Sik Kwak, Ph.D., Seung-Yeup Han, M.D.  
Eun-Ah Hwang, M.D., Sung-Bae Park, M.D.  
and Hyun-Chul Kim, M.D.

Dong San Kidney Institute and CDR Center  
Keimyung University School of Medicine,  
Taegu, Korea

**Background :** The present study was aimed to know the cause of impaired bactericidal activity, especially the metabolism of oxygen free radicals in neutrophils from patients with end-stage renal disease (ESRD).

**Methods :** We measured the amount of superoxide anion, the activity of three antioxidant enzymes, myeloperoxidase, copper ion level, zinc ion level and the amount of malondialdehyde in neutrophils from patients with ESRD before and after hemodialysis. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for superoxide dismutase (SOD) was also done.

**Results :** The malondialdehyde level, the amount of superoxide anion, catalase, and myeloperoxidase levels in the neutrophils from the patients with ESRD were higher than those from healthy controls. SOD activity, hydrogen peroxide level and zinc level were lower in ESRD patients. On the RT-PCR, the relative index, which is defined the ratio of the band densities for SOD to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, was decreased in neutrophils from patients with ESRD. Glutathione peroxidase activity in the neutrophils from ESRD patients did not show any significant change.

**Conclusion :** These results indicate that there are some alterations in metabolism of oxygen free radicals including lower levels of hydrogen peroxide which exerting a direct germicidal ability, due to decreased gene expression and mineral levels. And these alterations might be one of the major mechanisms of impaired microbicidal activity in patients with ESRD. (*Korean J Nephrol* 2004;23(3):429-438)

**Key Words :** Oxygen free radical, Neutrophils, End-stage renal disease (ESRD)

### 참 고 문 헌

- 1) Powe NR, Jaar B, Furth SL, Hermann J, Briggs W : Septicemia in dialysis patients : incidence, risk factors, and prognosis. *Kidney Int* 55:1081-1090, 1999
- 2) Sarnak MJ, Jaber BL : Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int* 58:1758-1764, 2000
- 3) Tan SH, Prowant BF, Khanna R, Nolph KD, Twardowski ZJ : Cardiovascular comorbidity and mortality in patients starting peritoneal dialysis : an American midwestern center experience. *Adv Perit Dial* 17:142-147, 2001
- 4) Hebert MJ, Masse M, Vigneault N, Sirois I, Troynov S, Madore F : Soluble fas is a marker of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 38:1271-1276, 2001
- 5) Herzog CA, Apple FS : Cardiac biomarkers in the new millennium. *Semin Dial* 14:322-323, 2001
- 6) Szeto CC, Chow KM, Leung CB, Wong TY, Wu AK, Wang AY, Lui SF, Li PK : Clinical course of peritonitis due to *Pseudomonas* species complicating peritoneal dialysis : a review of 104 cases. *Kidney Int* 59:2309-2315, 2001
- 7) Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG : Impaired phagocytosis in dialysis patients : studies on mechanisms. *Am J Nephrol* 11:102-111, 1991
- 8) Vanholder R, Ringoir S : Polymorphonuclear cell function and infection in dialysis. *Kidney Int* 38:S91-S95, 1992
- 9) Vanholder R, Dell'Aquila R, Jacobs V, Dhondt A, Veys N, Waterloos MA, Van Landschoot N, Van Biesen W, Ringoir S : Depressed phagocytosis in hemodialyzed patients : in vivo and in vitro mechanisms. *Nephron* 63:409-415, 1993
- 10) Haag-Weber M, Mai B, Horl WH : Isolation of a granulocyte inhibitory protein from uraemic patients with homology of beta 2-microglobulin. *Nephrol Dial Transplant* 9:382-388, 1994
- 11) Murray RK : Red and white blood cells. In Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW (Eds) : *Harper's Biochemistry*. 25th ed. London, Appleton & Lange, 2000, p763-779
- 12) Halliwell B, Gutteridge JMC : Protection against oxidants in biological systems : The superoxide theory of oxygen toxicity. In Halliwell B, Guttridge JMC (Eds) : *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press, 1989, p86-187
- 13) Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM : The NADPH oxidase of leukocytes : The respiratory burst oxidase. In Scandalios JG (Ed) : *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p737-783
- 14) Clark RA, Nauseef WM : Preparation and functional analysis of human nonlymphoid cells. In Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (Eds) : *Current protocols in immunology*. Washington DC, National Institutes of Health, 1993, Vol. 1, p7.23.1-17
- 15) Yen A, Guernsey DL : Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Res* 46:4156-4161, 1986
- 16) Auchlar C, Voisin E : Nitroblue tetrazolium reduction. In Auchlar C, Voisin E (Eds) : *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc, 1984, p123-132
- 17) Bleau G, Giasson C, Brunette I : Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Anal Biochem* 263:13-17, 1998
- 18) Sun Y, Oberley LW, Li Y : A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497-500, 1988
- 19) Nelson DP, Kiesow LA : Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in UV). *Anal Biochem* 49:474-478, 1972
- 20) Paglia DE, Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169, 1967
- 21) Buege JA, Aust SD : Microsomal lipid peroxidation. In Colowick SP, Kaplan NO (Eds) : *Methods in Enzymology*. Volume 52. New York, Academic Press, 1978, p302-310
- 22) Moslen MT : Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In Armstrong D (Ed) : *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press, 1994, p17-27
- 23) Puchard NA, Kelly FJ : Introduction. In Puchard NA, Kelly FJ (Eds) : *Free Radicals*. Oxford, Oxford University Press, 1996, p1-8
- 24) Kourounakis PN, Tsakitzis K, Kourounakis AP,

- Galanakis D : Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology* **144**:205-210, 2000
- 25) Maczewski M, Beresewicz A : The role of endothelin, protein kinase C and free radicals in the mechanism of the post-ischemic endothelial dysfunction in guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* **32**:297-310, 2000
- 26) Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP : Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* **293**:53-62, 2000
- 27) Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Vina J : Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* **32**:189-198, 2000
- 28) Yokozawa T, Chung HY, Kim DW, Goto H : Involvement of superoxide and/or nitric oxide in renal tissue injury. *Exp Toxicol Pathol* **51**:517-521, 1999
- 29) 문교철, 권진경 : 말기 신부전 환자에서 구리와 아연 이온 농도가 적혈구의 superoxide dismutase 활성에 미치는 영향. *대한신장학회지* **18**:265-269, 1999
- 30) Sechi LA, Orecchioni C, Melis A, Pala A, Tedde R : Trans-membrane cationic flow and hemodialysis. *Boll Soc Ital Biol Sper* **66**:1001-1008, 1990
- 31) Kaji D, Thomas K : Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in chronic renal failure. *Am J Physiol* **252**:F785-F793, 1987
- 32) 서상혁, 문교철, 박성배, 김현철 : 시안산이 superoxide dismutase의 carbamylation과 활성에 미치는 영향. *대한신장학회지* **19**:1121-1128, 2000
- 33) Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T : Renal antioxidant enzymes : their regulation and function. *Kidney Int* **45**:1-9, 1994
- 34) Drueke TB, Khoa TN, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Lacour B, Descamps-Latscha B : Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int* **78**:S114-S119, 2001