

Tacrolimus 투여 후 발생한 신병변의 초미세형태학적 변화와 Transforming Growth Factor- β 1의 발현

계명대학교 신장연구소, 계명대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²병리학교실

한승엽¹ · 김현철¹ · 정효순² · 박관규²

Ultrastructural Changes and Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Tacrolimus-Induced Nephropathy

Seung Yeup Han, M.D.¹, Hyun Chul Kim, M.D.¹, Hyo Soon Jeong² and Kwan Kyu Park, M.D.²

Dongsan Kidney Institute, Departments of ¹Internal Medicine and ²Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: Tacrolimus (FK506) is a new potent immunosuppressive agent which has been used as a primary immunosuppressive agent and rescue therapy for refractory rejection in kidney transplantation. *In vitro*, on a molecular basis, tacrolimus is 10 to 100 times more potent than cyclosporine. Complications associated with tacrolimus are similar to those seen in cyclosporine, including nephrotoxicity. An early marker of tacrolimus-induced nephropathy is tubular vacuolization, whereas long-term administration of tacrolimus is associated with striped interstitial fibrosis and arteriolar hyalinosis. However, morphological changes and pathogenesis of fibrosis in chronic tacrolimus-induced nephropathy remain poorly understood. Transforming growth factor (TGF)- β 1 has been implicated in the fibrosis of a number of chronic diseases of the kidney and other organs. This study was designed to clarify the ultrastructural changes of tacrolimus-induced nephropathy, and to evaluate the relationship between tacrolimus-induced nephropathy and expression of TGF- β 1. **Methods:** Male ICR mice received tacrolimus daily at a dose of 2.5 mg/kg by intraperitoneal route for 12 weeks and sacrificed 1, 4, 8, 10, and 12 weeks after the initiation of the study, respectively. The kidneys were removed, the cortex is carefully dissected from the medulla, and the tissues are processed

for evaluation by light microscopy, electron microscopy, immunohistochemistry and RT-PCR for RNA analysis. **Results:** Characteristic histological changes of tacrolimus-induced nephropathy were peritubular capillary and intraglomerular capillary congestions, vacuolizations of the tubular epithelium, pericapillary focal fibrosis, and tubular atrophy. Tacrolimus-treated kidneys had a progressive increase in the expression of TGF- β 1, especially in the glomerular and interstitial capillary endothelial cells and atrophied tubular epithelial cells. TGF- β 1 mRNA is expressed persistently in tacrolimus-treated mice for 12 weeks. **Conclusion:** It can be concluded that TGF- β 1 may be involved in the fibrogenesis in the tacrolimus-induced nephropathy. (J Korean Soc Transplant 2002;16:62-69)

Key Words: Tacrolimus nephrotoxicity, TGF- β 1, Fibrogenesis
중심 단어: Tacrolimus 신독성, TGF- β 1, 섬유화

서 론

Tacrolimus (FK506)는 1984년 *Streptomyces tsukubaensis*의 대사물에서 처음 분리된 macrolide 계 항생물질로 1989년 간장 이식에 처음 면역억제제로 사용된 후 각종 장기 이식에서 기본 면역억제제로 사용되어 좋은 결과를 얻고 있다. Tacrolimus는 신장 이식의 경우 일차 면역억제제로 사용되고 있을 뿐만 아니라 난치성 거부 반응의 구조 요법으로도 사용되고 있다.(1,2) Tacrolimus는 cyclosporine과 화학 구조는 다르나 면역학적 작용기전은 유사하다. 이 두 약제는 calcineurin에 결합하여 interleukin-2 (IL-2) 유전자의 전사를 방해함으로써 IL-2의 생성을 억제한다. Tacrolimus는 혼합 립포구 배양, 세포독성 T세포의 생성 및 T세포의 IL-2 수용체 발현 등의 시험관 실험에서 면역억제능이 cyclosporine보다 10~100배 강력한 것으로 보고되었다.(3)

초기의 보고에서는 tacrolimus는 cyclosporine에 비해 신독성이 적다고 보고되었으나,(4) 최근 동물과 인간의 이식을 대상으로 한 장·단기 연구에서 tacrolimus도 상당한 신독성이 있음이 보고되었다.(2) McDiarmid 등(5)은 간장

책임저자 : 김현철, 대구광역시 중구 동산동 194번지
계명대학교 동산의료원 신장내과, 700-712
Tel: 053-250-7355, Fax: 053-254-8168
E-mail: k780121@dsmc.or.kr
본 논문의 요지는 2002년 제22차 대한신장학회에서 발표되었음.

이식에서 사구체 여과율이 이식 전에 비해 cyclosporine 투여군에서는 96%, tacrolimus 투여군에서는 52% 감소함을 보고한 바 있다. Tacrolimus 신독성의 초기 형태학적 변화는 근위 신세뇨관 상피세포 내 PAS 양성의 과립 형성과 사구체 옆 장치 내 레닌파립의 증가, 세뇨관 상피 세포의 공포화 변성 등으로 보고되었으며(6) tacrolimus의 만성 신독성은 간질의 섬유화, 혈관벽의 비후 등으로 보고되었다.(7) 혈관벽의 비후는 초자양물질의 침착과 근세포 증식에 의해 형성되는데 이런 과정에 성장인자가 관여할 것으로 생각된다.

Transforming growth factor (TGF)- β 는 다기능 사이토카인으로 인간과 실험동물의 신섬유화 병변에서 발현되고(8) cyclosporine 신독성의 경우 TGF- β 1 발현의 증가가 신섬유화를 일으키는 것으로 보고되었다.(9) Jeong 등(10)은 흰쥐에 tacrolimus를 투여하여 투여 기간에 비례하여 TGF- β 1 단백의 발현이 증가함을 보고하였다.

현재까지 tacrolimus에 의해 유발되는 신독성의 초미세 형태학적인 보고가 드물고 tacrolimus 만성 신독성에서 흔히 관찰되는 신섬유화가 초래되는 기전 또한 아직 명확히 규명되어 있지 않다. 저자들은 마우스에 tacrolimus를 투여하여 실험적으로 유발한 신병변의 초미세 형태학적인 변화를 관찰하여 먼저 tacrolimus 신독성의 명확한 형태학적 특징을 규명하고자 하였다. 이는 신장이식 후 발생되는 거부반응과의 감별을 용이하게 함으로써 적절한 치료를 통해 이식신의 생존율을 향상시키는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 tacrolimus 투여 후 초래되는 신섬유화 병변에서 TGF- β 1 발현 양상을 관찰하고 형태학적 변화와 TGF- β 1 발현의 상관관계를 규명하여 tacrolimus 신독성의 기전을 알아보고자 하였다.

방법

1) 실험동물

30 g 내외의 ICR 마우스 수컷을 사용하여 실험군과 대조군으로 나누어 실험하였다. 25마리의 실험군 마우스에게 tacrolimus (후지사와제약, 오사카, 일본) 2.5 mg/kg, 10 마리의 대조군 마우스에게는 같은 양의 생리식염수를 매일 복강 내로 투여하였다. 저염식으로 인한 신섬유화의 촉진을 예방하기 위해 식이는 자유롭게 하였다. 1주, 4주, 8주, 10주, 12주에 실험군 5마리와 대조군 2마리를 각각 경추 탈골로 도살한 후 개복하여 신장을 적출하였다. 적출된 신장에서 광학현미경 검사, 전자현미경 검사, 면역조직화학 염색 및 RNA 분석을 위한 조직을 각각 채취하였다.

2) 광학현미경 검사

적출된 신장을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수한

후 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 포매 조직으로부터 2 μ m 두께의 절편을 만들어 통상적인 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 Masson's trichrome 염색을 시행하여 광학현미경으로 형태학적 변화를 관찰하였다.

3) 전자현미경 검사

전자현미경 검사를 위해 조직을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M phosphate buffered, pH 7.4)으로 0~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M 인산 염 완충 식염수(PBS, pH 7.4)로 세척한 후 1% osmium tetroxide에 2시간 후고정을 하고 같은 완충용액으로 세척하여 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법(11)에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열증합시켰다. 포매된 조직을 1 μ m 두께로 박절하여 toluidine blue 염색을 하여 관찰 부위를 결정하였고, 초박절은 Sorvall MT 5,000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson (12) 및 Reynolds (13) 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 시행하고 Hitachi H-7100 투과전자현미경으로 관찰하였다.

4) TGF- β 1 단백에 대한 면역조직화학 염색

포르말린용액으로 고정하고 파라핀으로 포매한 신장조직을 2 μ m 두께로 잘라 유리 슬라이드에 부착하였다. 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 0.3% 과산화수소와 혼합한 메탄올에 슬라이드를 30분간 담궈 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단시키고 0.01 M PBS에서 10분간 세척하였다. 일차 항체로 1 : 200으로 희석한 TGF- β 1 항체(rabbit anti-porcine TGF- β 1 polyclonal antibody, Cell Sciences, U.S.A.)를 사용하여 37°C에서 1시간 처리하였다. Biotinylated anti-mouse IgG (DAKO LSAB kit, U.S.A.)를 사용하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 streptoavidine peroxidase (DAKO LSAB kit, U.S.A.)로 30분간 실온에서 반응시켰다. 그 다음에 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 핵과 세포질에서 갈색의 발색이 나타나면 양성으로 판정하였다.

5) TGF- β 1 mRNA에 대한 In situ Hybridization

2% 3-aminopropyl triethoxysilane (APES, Sigma, U.S.A.)과 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma, U.S.A.)로 처리한 유리 슬라이드에 4% paraformaldehyde에 고정하여 만든 파라핀 조직을 2 μ m 두께로 불이고 60°C 오븐에 1시간 방치하여 조직 절편을 슬라이드에 부착시켰다. 조직 절편이 붙은 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀하고 계열 에탄올로 함수한 후 DEPC 처리한 중류수로 수세하였다. 조직 절편

위에 50 µg/mL 농도의 proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany)를 100 µL 취하고 37°C에서 15분간 반응시켜 세포질 및 핵의 단백 일부를 제거한 후 DEPC 처리한 증류수로 수세하였다. 0.4% paraformaldehyde로 4°C에서 20분간 후고정하고 상온에서 0.2% glycine 용액으로 처리한 후 95% 에탄올로 세척하여 공기 중에 건조시켰다. Hybridization을 실시하기 전에 prehybridization buffer (50% deionized formide in 4× sodium salt citrate, SCC)로 37°C에서 1시간 동안 prehybridization을 시켰다. Hybridization에 사용한 소식자는 TGF- β 1에 상보적인 297 mer의 PCR 산물로써 digoxigenin을 표지하여 사용하였다. 반응용액의 조성과 최종 농도는 각각 40% formamide (Sigma, U.S.A.), 4×SCC, 1×Denhardt's 용액, 0.5 mg/mL salmon sperm DNA (Sigma, U.S.A.), 0.5 mg/mL tRNA, 10 mmol DTT로 조절하고 digoxigenin으로 표지한 소식자는 5 ng/µL 농도로 사용하였다. 조직절편 위에 50 µL의 반응용액을 취하여 덮개유리를 덮은 후 42°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 결합되지 않은 소식자를 제거하기 위해 50% formamide/2×SCC 용액으로 55°C에서 30분간 1회, 2×SSC 용액으로 20분, 0.2×SSC 용액으로 실온에서 20분간 수세하였다. 비특이반응 억제제(0.5% bovine serum albumin)로 37°C에서 30분간 처리한 후 anti-digoxigenin Fab alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 37°C에서 30분간 결합반응시켰다. Nitroblue tetazolium (Boehringer Mannheim, Germany)과 5-bromo-4-chloroindolyl phosphate (Boehringer Mannheim, Germany)로 4°C에서 하룻밤 동안 발색반응시키고 methyl green으로 대조 염색하였다. 음성 대조군은 동일한 조직 절편에 대하여 소식자를 제외한 반응용액으로 hybridization시킨 것 이외에는 모든 과정을 실험군과 동일하게 실시하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵에 미만성으로 암청색의 발색이 나타나면 양성으로 판정하였다.

6) TGF- β 1 mRNA에 대한 Reverse Transcriptase (RT)-PCR

신장에서 추출한 전량의 RNA로부터 cDNA를 합성하여 PCR을 실시하였다. cDNA 합성은 1×buffer, 125 mmol dNTPs, 15 µg/mL oligo d(T)¹⁵ primer, 4 µg의 전량의 RNA, 8 unit MMLV 역전사효소가 포함된 반응액으로 42°C에서

1시간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 주형으로 반응액의 총 부피를 25 µL로 하고 반응액의 조성 및 최종 농도는 1×buffer, 0.15 mmol dNTPs, 각각 0.05 µmol primer, 1 unit Taq DNA polymerase가 되도록 증류수로 조절하였고, 반응 조건은 94°C에 30초, 54°C에 1분 30초, 72°C에 2분씩 35회 반복해서 반응시켰다. 반응산물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 조명기로 증폭된 DNA를 확인하였다. 반응에 사용한 primer는 Jin 등(14)이 사용한 sense와 anti-sense oligonucleotide를 사용하였으며 염기서열 및 반응산물의 크기는 Table 1과 같다. 음성 대조군은 주형 DNA 대신에 증류수를 사용하여 모든 과정을 실험군과 동일하게 실시하였다.

결 과

1) 광학현미경 관찰

대조군과 비교 시 tacrolimus 투여 1주 후 근위세뇨관 주위의 모세혈관에 울혈이 관찰되었다. 4주 후에는 세뇨관 주위의 모세혈관에 울혈과 함께 세뇨관 주위에 염증 세포의 침윤이 나타났다. 8주에는 세뇨관 주위 모세혈관 뿐만 아니라 사구체 내 혈관에서도 울혈이 관찰되었으며, 일부의 세뇨관에서 위축이 나타났다. 12주에는 근위 세뇨관 상피세포의 부종과 공포화 변성이 관찰되었다. Trichrome 염색 후 관찰한 결과 세뇨관 주위의 국소 섬유화가 4주부터 나타났으며 12주까지 점차 증가하는 양상을 보였으나 미만성 섬유화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

2) 전자현미경 검사

Tacrolimus 투여 4주 후에는 근위 세뇨관 상피세포에 리소솜이 관찰되었고 공포화 변성이 나타났으며 혈관 주위의 섬유화가 관찰되었다. 8주에서 이러한 섬유화가 더욱 진행되어 뚜렷한 콜라겐 섬유를 관찰할 수 있었다. 근위 세뇨관에서 공포화 변성이 증가하였으며, 근위세뇨관에 비해서 원위세뇨관은 이러한 변화가 경미하였다. 12주에서는 혈관 주위에 림프구의 침윤이 있었고 섬유화를 관찰할 수 있다. 세뇨관 상피세포에는 등척성 공포(isometric vacuole)의 증가가 관찰되었다(Fig. 2).

Table 1. Sequences of primers of TGF- β 1, TNF- α and GAPDH

Gene	5' primer (5'-3')	3' primer (5'-3')	Product size (bp)
TGF- β 1	AAGAACTGCTGTGCGG	GCACTTGCAGGAGCGCACAA	297
TNF- α	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	AATGCATCCTGCACCACCAA	308
GAPDH	AATGACTCCAAAGTAGACC	GTAGCCATATTCAATTGTCATA	516

TGF = transforming growth factor; TNF = tumor necrosis factor; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; bp = base pair.

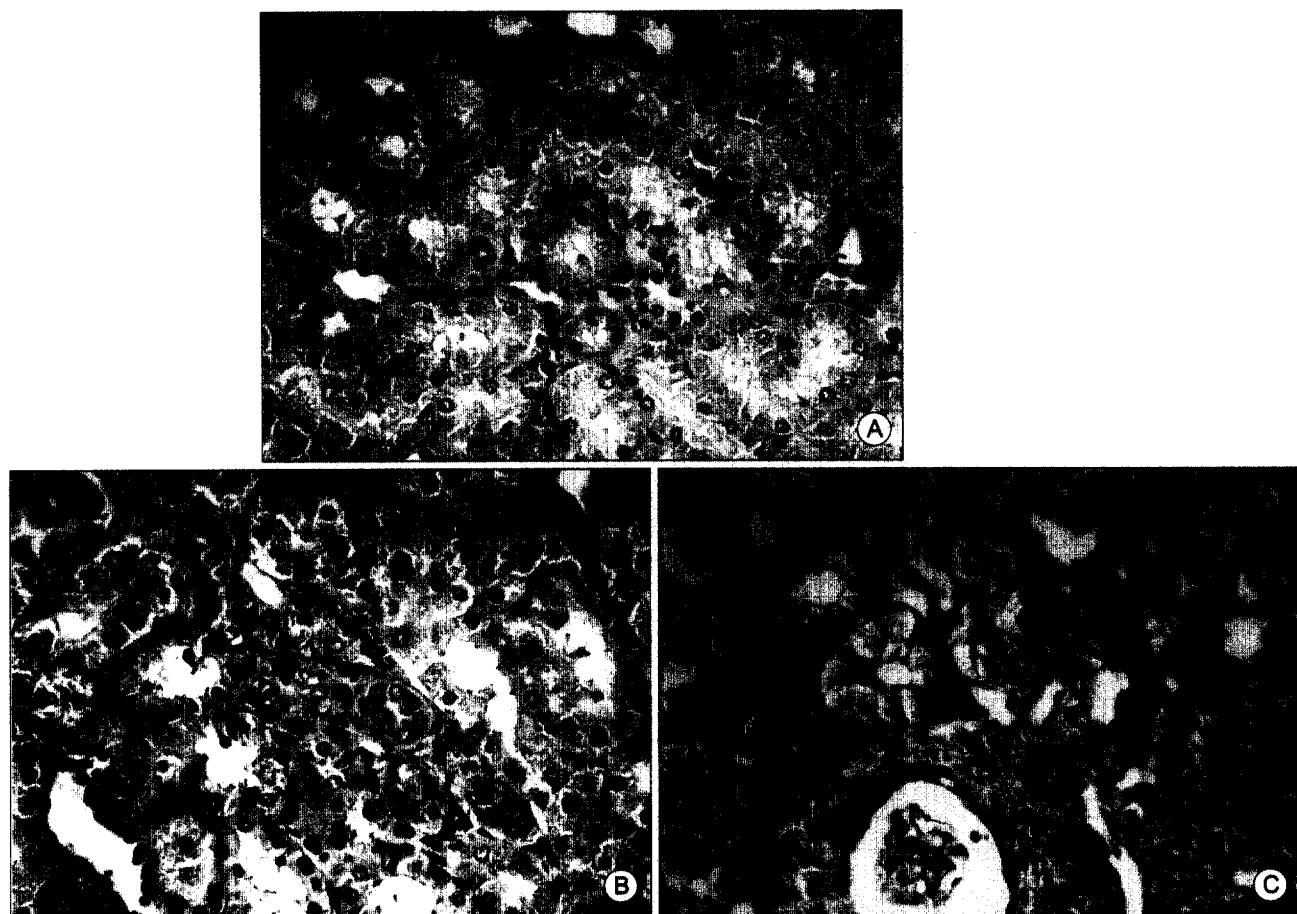


Fig. 1. Light microscopic findings of the tacrolimus-treated mouse kidney. (A) Peritubular capillaries are congested at the tacrolimus-treated mouse kidney for four weeks (H&E, $\times 200$). (B) Atrophied tubules of the tacrolimus-treated mouse kidney for 10 weeks are present (H&E, $\times 200$). (C) Focal interstitial fibrosis of the tacrolimus-treated mouse kidney for 12 weeks are present (Masson's trichrome stain, $\times 200$).

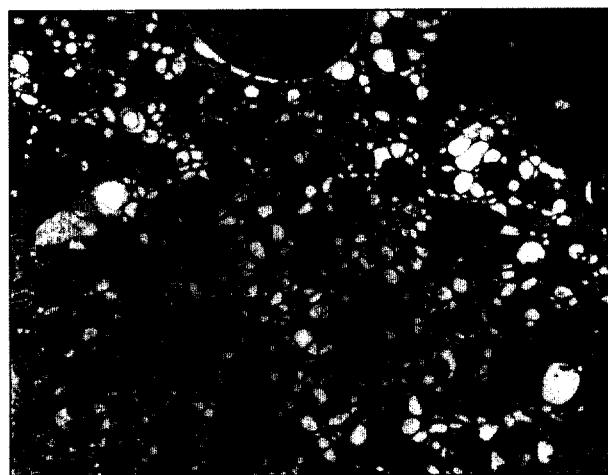


Fig. 2. Electron microscopic findings of the tacrolimus-treated mouse kidney for 12 weeks. Isometric vacuoles and electron dense lysosomes are found at proximal tubular epithelium (TEM, original magnification $\times 5,000$).

3) TGF- β 1 단백에 대한 면역조직화학 염색

TGF- β 1 단백의 발현과 그 발현 부위를 관찰하기 위하여 면역조직화학 염색을 실시한 결과 대조군에서는 음성 이었으며, tacrolimus 투여 1주 후 세뇨관 상피세포 사이의 모세혈관들과 사구체 내 모세혈관의 내피세포에서 TGF- β 1 단백이 약하게 양성으로 나타났다. 4주에는 사구체 내 혈관의 내피 세포에서 발현이 증가되었고, 근위세뇨관 상피세포의 내강측에서도 발현이 관찰되었다. 8주에 혈관에서 발현 부위를 관찰한 결과 내피 세포에서 TGF- β 1 단백이 발현됨을 알 수 있었다. 10주에서는 세뇨관 상피 세포 사이의 모세혈관들과 사구체 내 모세혈관의 내피 세포, 세뇨관 상피 세포에서 TGF- β 1 단백이 발현되었고, 위축된 세뇨관 상피에서도 발현이 증가되었다. 12주에도 이와 유사하게 관찰되었다(Fig. 3).

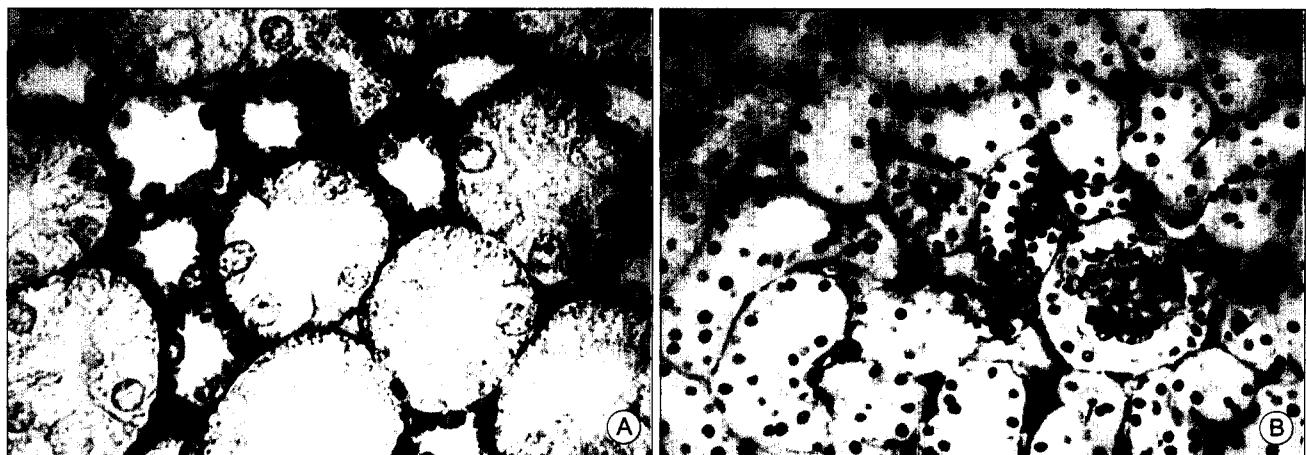


Fig. 3. (A) Atrophied epithelial cells of the tacrolimus-treated mouse kidney for 10 weeks are strongly positive for TGF- β 1 (Immunohistochemistry, $\times 400$). (B) The endothelial cells of glomerulus, peritubular capillaries and tubular epithelial cells of the tacrolimus-treated mouse kidney for 12 weeks are positive for TGF- β 1 (Immunohistochemistry, $\times 400$).

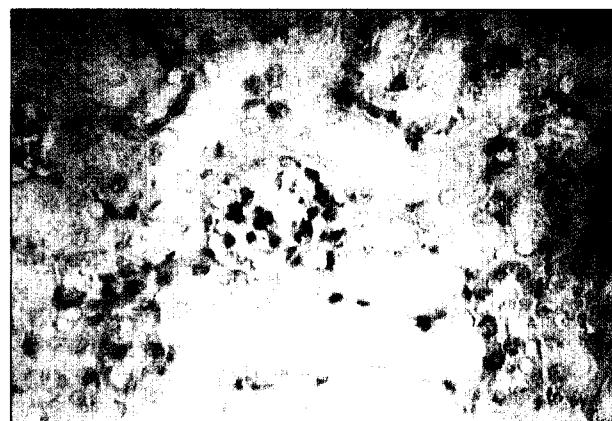


Fig. 4. TGF- β 1 mRNA is expressed at the endothelial cells of the glomerulus of the tacrolimus-treated mouse kidney (*In situ* hybridization, $\times 200$).

4) TGF- β 1 mRNA에 대한 *In situ* Hybridization

TGF- β 1 mRNA에 대한 *In situ* hybridization 결과 대조군에서는 그 발현이 관찰되지 않았으나, tacrolimus 투여군에서는 사구체 내의 혈관 내피 세포와 간질의 혈관 내피 세포에서 TGF- β 1 mRNA가 발현됨이 관찰되었다(Fig. 4).

5) TGF- β 1 mRNA에 대한 Reverse Transcriptase (RT)-PCR

TGF- β 1 mRNA의 발현을 관찰하기 위하여 실시한 RT-PCR 결과 대조군에서는 음성이었으나 실험군에서는 1주부터 대조군에 비해 강하게 발현되었으며, 10주군까지 그 발현 정도가 비슷하다가 12주에는 다소 감소하는 양상을 보였다. 한편 TNF- α mRNA에 대한 RT-PCR 결과는 실험

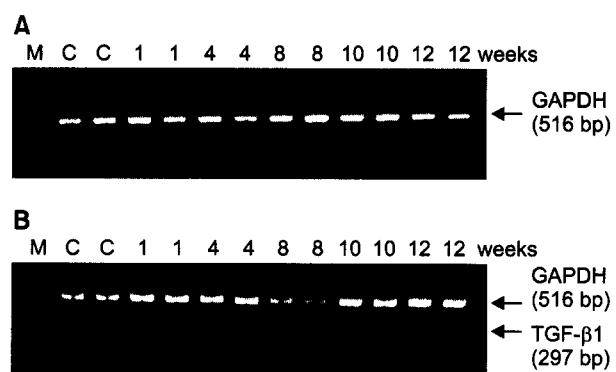


Fig. 5. TGF- β 1 and TNF- α mRNA expression analyzed by RT-PCR in the control and the tacrolimus-treated mouse kidney. (A) TNF- α mRNA is not expressed in the control and the tacrolimus-treated mouse kidney. (B) TGF- β 1 mRNA is expressed in the tacrolimus-treated mouse kidney. M = size marker; C = control group; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

군과 대조군 모두에서 발현되지 않았다(Fig. 5).

고 찰

Tacrolimus의 신독성의 형태학적 특징에 대한 일부의 보고들(7,15)이 있으나, 주로 신이식 환자에 있어서 tacrolimus의 투여 후 거부 반응이나 구조 요법 중에 신조직 검사가 시행되어 tacrolimus 신독성의 형태학적 변화를 규명하는데 한계가 있다. 따라서 동물 모델에서 실험적으로 유발된 tacrolimus 신독성의 형태학적 관찰이 인체에서 신이식 후 거부 반응과 tacrolimus 신독성을 감별하는데 도움이 될 것으로 생각한다.

Tacrolimus는 cyclosporine과 구조는 다르나 신독성은 유사한 것으로 보고되고 있다. Yamada 등(6)은 흰쥐에서 tacrolimus를 14일간 복강 내 투여 후 사구체 옆 장치 내 레닌파립의 증가, 세동맥 근세포 내 레닌파립의 출현 등의 소견을 보고하였고, 7일째 근위세뇨관 상피세포 내 PAS 양성 파립이 관찰되었으며 이러한 과립은 14일째 그 수가 감소하였고 공포화 변성을 보임을 보고하였다. Shihab 등(16)은 흰쥐에게 tacrolimus를 28일간 피하 주사한 연구에서 세뇨관의 국소성 허탈과 공포화 변성, 간질의 부종, 단백구 침윤, 간질의 선상(striped pattern) 섬유화를 보고하였다. 일본의 FK506 연구 그룹의 보고(7)에 의하면 tacrolimus 신독성 초기에는 신세뇨관의 공포화 변성, 세동맥의 초자화 피사가 나타나며 후기에는 미만성 간질의 섬유화가 나타났다. 본 연구에서도 광학 및 전자현미경 검사상 혈관 주위의 염증세포 침윤, 신세뇨관 상피세포 내 리소솜, 세뇨관 상피 세포의 공포화 변성이 관찰되었으며 8주 이후에는 세뇨관의 위축이 나타났다. Tacrolimus 투여 1주 후에 근위세뇨관 주위 모세혈관의 울혈이 관찰되었는데 이는 tacrolimus의 신독성이 혈관에서 시작됨을 시사한다. 모세혈관 주위의 섬유화는 국소적으로 나타났으며 12주까지 관찰에서 간질의 선상 혹은 미만성 섬유화는 관찰되지 않았다.

Tacrolimus 신독성에 대한 기전은 아직도 명확히 밝혀져 있지 않다. Kumano 등(17)은 흰쥐에 tacrolimus를 21일간 경구 투여한 결과 사구체 여과율이 감소하고 세동맥의 근세포에 공포화 변성이 나타났으며 혈관 확장제 투여로 이러한 신손상이 감소됨을 관찰하고 tacrolimus 신독성은 혈관 손상과 관련 있다고 추정하였다. Yamada 등(6)은 tacrolimus 투여 시 사구체 옆 장치가 증식되고 레닌 염색도가 증가된다고 보고하고 있어 레닌 혹은 prostaglandin의 불균형도 혈관 수축에 관여할 것으로 생각된다. Tacrolimus 신독성에 있어 혈관 수축 및 사구체 여과율 감소가 급성 독성의 특징이라면 만성 독성은 혈관벽의 비후 및 간질의 섬유화라고 할 수 있다. 혈관벽의 비후는 초자양물질의 침착과 근세포 증식에 의해 유도되고 이러한 과정에 성장 인자가 작용할 것으로 생각된다.

TGF- β 는 혈소판, T세포, 단백구 및 대식 세포에서 분비되는 다기능 사이토카인으로 포유동물에서는 3가지 아형 (TGF- β 1, 2, 3)이 존재하는 것으로 보고되고 있다. TGF- β 는 생물의 발생, 세포의 분화와 성장, 조직 손상의 치유와 재생 과정에 관여하고 세포외기질의 축적에 관련이 있으며, 여러 장기의 섬유화 병변을 초래할 수 있다.(18) TGF- β 1은 인간과 실험 동물의 신섬유화 병변에서도 발현된다. Okuda 등(19)은 흰쥐에서 실험적으로 유발한 사구체 신염 모델에서 세포외기질인 proteoglycan과 fibronectin의 합성 증가와 TGF- β 1 mRNA 및 단백의 발현이 증가되어 있고, TGF- β 1에 대한 항혈청 투여로 proteoglycan과 fibronectin

의 합성이 억제됨을 관찰하고 TGF- β 1이 신장에서 세포외 기질의 축적과 관련이 있음을 보고하였다. Cyclosporine 신독성에서도 TGF- β 1이 섬유화를 유발하여 cyclosporine 신독성을 일으키는 원인으로 보고되었다. Khanna 등(20)은 마우스에 cyclosporine을 투여하여 TGF- β 1이 증가하고 이러한 TGF- β 1은 섬유화 유발 사이토카인으로 작용하여 신섬유화를 유발하는 것으로 보고하였다. Nicholson 등(9)은 cyclosporine을 투여 받은 신장이식 환자의 이식신에서 TGF- β 1 mRNA의 증가가 콜라겐, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)의 mRNA 증가와 상관관계를 보여 TGF- β 1이 이식신에서 섬유화를 유발하는 사이토카인임을 보고하였다.

Cyclosporine과 유사한 기전으로 신독성이 유발될 것으로 생각되는 tacrolimus 신독성에서도 TGF- β 1이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. Khanna 등(21)은 T세포, A549 세포(human lung adenocarcinoma cell line), 말초 단백구에서 tacrolimus 투여로 TGF- β 1 단백의 증가를 보여 TGF- β 1이 tacrolimus의 면역억제 효과와 함께 섬유화로 인한 신독성에도 관여함을 보고하였다. Shihab 등(16)은 tacrolimus를 투여한 흰쥐에서 TGF- β 1 mRNA가 시간의 경과에 따라 증가함을 보고하였고, Jeong 등(10)은 tacrolimus를 투여한 흰쥐에서 TGF- β 1이 수입 세동맥과 사구체 옆 장치에서 증가하였으며 이는 투여 기간에 비례하여 증가함을 보고하였다.

본 실험에서 면역조직화학 염색 결과 tacrolimus 투여 후 1주에서부터 TGF- β 1 단백의 발현이 나타났으며 주로 세뇨관 상피세포 주위의 혈관 부위와 사구체 내의 혈관 부위에서 발현되었다. 8주에 혈관에서 TGF- β 1의 발현 부위를 확인할 수 있었는데 특히 혈관의 내피 세포에서 강하게 발현되었다. 이는 tacrolimus 신독성이 소혈관부터 침범함을 시사한다. TGF- β 1은 혈소판, T세포, 단백구 및 대식 세포에서 생성된다고 알려져 있으나, 신섬유화를 유발하는 TGF- β 1의 신장 내 발현부위에 대하여는 보고자에 따라 많은 차이를 보이는데 발현 부위로 세뇨관 상피 세포,(22) 신간질,(23) 사구체의 혈관간세포,(24) 혈관의 평활근세포,(25) 사구체 수입 세동맥(26) 등이 보고되고 있다. 본 실험에서 초기에 혈관의 내피세포에서 TGF- β 1이 발현되었는데 이는 tacrolimus가 사구체 내피 세포에서 TGF- β 1의 합성을 증가시키고 증가된 TGF- β 1이 사구체 내로 확산되어 사구체 벽세포나 혈관 간세포에서 TGF- β 1이 발현된다고 생각할 수 있다. 또, 세뇨관 상피 세포에서의 TGF- β 1 발현은 사구체 내피세포에서 만들어진 TGF- β 1이 한 외여과를 통해서 또는 세뇨관 주위의 모세혈관의 혈류에 의해 세뇨관 상피세포로 전달되는 것으로 추측할 수 있다.(27) 본 실험에서도 모세혈관 내피세포에서 먼저 TGF- β 1 단백이 발현되었고 이후 세뇨관 상피세포에서도 TGF- β 1의 발현이 나타났으며 주로 세뇨관 상피세포의 내강측

에서 발현되었고 8주 후부터 세뇨관 전 상피세포에 발현됨을 관찰할 수 있었다.

사람의 신장이식 생검조직에서 cyclosporine과 tacrolimus의 신섬유화 정도를 비교한 Bicknell 등(28)의 성적에 의하면 tacrolimus에 비해 cyclosporine 투여군에서 콜라겐 III, TIMP mRNA 발현이 유의하게 높음을 관찰하고 cyclosporine에 비해 tacrolimus가 신섬유화 영향이 적다고 보고하였다. 본 실험에서는 cyclosporine 신독성의 형태학적 변화를 기술한 Mihatsch 등(29)의 보고에서와 같은 신간질의 미만성 섬유화 병변은 관찰되지 않아서 cyclosporine에 비해 상대적으로 tacrolimus는 신독성이 적을 것으로 추정된다. 그러나 본 실험에서 tacrolimus 투여군에서 12주까지 TGF- β 1 단백 및 mRNA가 지속적으로 발현되는 것은 실험기간을 연장할 경우 결국 신섬유화가 초래될 가능성이 있음을 시사한다.

결 론

마우스에 tacrolimus 2.5 mg/kg을 매일 복강 내에 투여하고 1주, 4주, 8주, 10주 및 12주에 도살하여 신장을 적출하여 광학현미경 및 전자현미경 검사, TGF- β 1 단백 및 mRNA의 면역조직화학 검사, RT-PCR 및 *in situ* hybridization을 실시한 결과 tacrolimus 신독성의 주된 형태학적 변화는 광학현미경 관찰에서 신실질 및 사구체 모세혈관의 울혈과 혈관주위의 경미한 염증소견, 세뇨관 상피세포의 위축과 공포화 변성이었으며, 국소적인 섬유화도 관찰되었다. 전자현미경 관찰에서는 세뇨관 상피 세포 내 리소솜 출현과 세뇨관 상피 세포의 공포화 변성 등의 경한 가역성 변화와 혈관 주위의 국소적인 섬유화였다. 면역조직화학 염색에서 TGF- β 1은 사구체 및 신실질 조직의 혈관 내피 세포에서부터 발현되었고 이후 세뇨관 상피 세포에서 발현되었다. TGF- β 1 mRNA는 투여 초기부터 대조군에 비해 강하게 발현되었으며, 12주까지 지속적으로 발현되었으나 12주에 다소 감소되는 양상을 보였다. Tacrolimus를 사용한 본 연구에서 신장조직의 미만성 섬유화는 관찰되지 않았으나 섬유화와 밀접한 관련이 있는 TGF- β 1이 지속적으로 발현되는 것으로 보아 혈관 내피 세포로부터 생성된 TGF- β 1이 혈관 주위에 세포 외 기질의 침착을 유도하고 신섬유화를 초래하여 신독성이 나타나는 것으로 추측할 수 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 연구에 사용된 Tacrolimus를 지원하여 준 한국 후지사와 약품주식회사에 감사드립니다.

REFERENCES

- Schleibner S, Krauss M, Wagner K. FK506 versus cyclosporin in the prevention of renal allograft rejection: European pilot study-six-week results. *Transpl Int* 1995;8:86-90.
- Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V, Fung J, Jensen C, Tzaki A, McCalley J, Carroll P, Ricordi C. FK506 in clinical kidney transplantation. *Transplant Proc* 1992;23:3065-7.
- Sawada S, Suzaki G, Kawase Y, Takaku F. Novel immunosuppressive agent, FK506 in vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol* 1987;139:1797-803.
- Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos R, Jain A, Alessiani M, Takaya S, Shapiro R. Liver, kidney and thoracic organ transplantation under FK506. *Ann Surg* 1990;212:295-305.
- McDiarmid SV, Colonna JOII, Shaked A, Ament ME, Busuttil RW. A comparison of renal function in cyclosporine-and FK506-treated patients after primary orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1993;56:847-53.
- Yamada K, Sugisaki Y, Akimoto M, Yamanaka N. Short-term FK506-induced morphological changes in rat kidney. *Transplant Proc* 1991;23:3130-2.
- Japanese FK506 Study Group. Morphological findings of renal allografts under FK506 therapy. *Transplant Proc* 1994;26:1933-6.
- Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor- β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1814-8.
- Nicholson ML, Bicknell GR, Williams ST, Furness PN. Is TGF- β 1 a profibrotic cytokine in human renal transplants? *Transplant Proc* 1998;30:952.
- Jeong HJ, Kim YS, Hong IC. Vascular endothelin, TGF-beta, and PDGF expression in FK506 nephrotoxicity of rats. *Transplant Proc* 1998;30:3596-9.
- Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:409-17.
- Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biochem Cytol* 1958;6:475-9.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.
- Jin L, Qian X, Kulig E, Sanno N, Scheithauer BW, Kovacs K, Young WF, Lloyd RV. Transforming growth factor- β , transforming growth factor- β receptor II, and p27^{kip1} expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *Am J Pathol* 1997;151:509-19.
- Randhawa PS, Tsamandas AC, Magnone M, Jordan M, Shapiro R, Starzl TE, Demetris AJ. Microvascular changes in renal allografts associated with FK506 (tacrolimus) therapy. *Am*

- J Surg Pathol 1996;20:306-12.
- 16) Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. Transplantation 1997;64:1829-37.
- 17) Kumano K, Endo T, Koshiba K. Functional and morphological changes in rat kidney induced by FK506 and its reversal by various vasodilators. Jpn J Urol 1992;83:650-7.
- 18) Border WA, Nobel NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. N Engl J Med 1994;331:1286-92.
- 19) Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA. Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of mesangial extracellular matrix. J Clin Invest 1990;86:453-62.
- 20) Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M. In vivo hyperexpression of transforming growth factor- β 1 in mice: stimulation by cyclosporine. Transplantation 1997;63:1037-9.
- 21) Khanna A, Cairns V, Hosenpud JD. Tacrolimus induces increased expression of transforming growth factor- β 1 in mammalian lymphoid as well as nonlymphoid cells. Transplantation 1999;67:614-9.
- 22) Pankewycz OG, Miao L, Isaacs R, Guan J, Pruett T, Hausmann G, Sturgill BC. Increased renal tubular expression of transforming growth factor beta in human allografts correlates with cyclosporine toxicity. Kidney Int 1996;50:1634-40.
- 23) Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TE, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennet WM, Couser WG, Johnson RJ. Pathogenesis of cyclosporin nephrotoxicity: Roles of angiotensin II and osteopontin. J Am Soc Nephrol 1995;6:1186-96.
- 24) Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Gold LI, Border WA. Transforming growth factor- β and matrix protein expression in acute and chronic rejection in human renal allografts. J Am Soc Nephrol 1995;6:286-94.
- 25) Mackay K, Kondaiah P, Danielpour D, Austin HA, Brown PD. Expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 2 in rat glomeruli. Kidney Int 1990;38:1095-100.
- 26) Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery AT, El Nahas AM. Cyclosporine enhances the expression of TGF- β in the juxtaglomerular cells of the rat kidney. Kidney Int 1995;48:1489-96.
- 27) Niemir ZI, Stein H, Noronha IL, Krüger C, Andrassy K, Ritz E, Walherr R. PDGF and TGF- β contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. Kidney Int 1995;48: 1530-41.
- 28) Bicknell GR, Williams ST, Shaw JA, Pringle JH, Furness PN, Nicholson ML. Differential effects of cyclosporin and tacrolimus on the expression of fibrosis-associated genes in isolated glomeruli from renal transplants. Br J Surg 2000;87:1569-75.
- 29) Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F, Thiel G. Cyclosporine nephrotoxicity. In: Tischer CC, Brenner BM (Eds): Renal pathology with clinical and functional correlations. Philadelphia, JB Lippincott; 1994. p. 1641-81.