

신 근위세관 세포에 대한 Cyclosporine A 독성*

가톨릭 의과대학 병리학교실

이 정 용

머 리 말

Cyclosporine A (CSA)는 T helper 세포에서 interleukin 2나 B 세포에 꼭 필요한 성장인자 생성을 억제하거나 cytotoxic T 세포증식을 억제하는 면역억제제로써^{1,2)} 1978년부터 각종 장기이식이나 자가면역질환에 널리 사용되어 왔다³⁾. 그러나 이약제는 신독성, 간독성 및 고혈압등의 부작용이 있으며 그중에서도 신독성이 가장 흔하고 임상적으로 중요할 뿐 아니라 궁극적으로 CSA 투여량의 제한요인으로 작용하고 있다. 그러나 그동안 수많은 연구자들이 CSA에 의한 신독성과 그기전에 대해 연구해 왔음에도 불구하고 이러한 신독성이 CSA의 직접적인 신독성에 의한 것인지 또는 많은 사람들이 주장하는 것과 같이 CSA에 의한 혈관내피손상⁴⁻⁶⁾ 또는 hemodynamic한 변화⁷⁻⁹⁾에 의한 2차적인 것인지에 대하여 이론이 분분하다.

이에 저자는 David 등⁴⁾이 주장하는 혈관 내피세포 손상 또는 혈류역학적인 변화와 같은 외적 요인을 제거하기 위해 사람 신 근위세관 세포를 분리 배양하여 여기에 직접적으로 CSA에 대한 독성을 검사하는 *in vitro* 실험을 통해 CSA가 신장에 직접적인 독성이 있는지 알아보고 아울러 세포외액에 존재하는 Ca^{2+} 양의 변화에 의한 신독성의 변화 유무도 함께 관찰해보고자 하였으며 또한 *in vivo*에서 관찰된 형태학적 소견들도 *in vitro* model에서도 관찰가능한지 추이해보고자 본 실험을 계획하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Eagle's minimum essential medium (MEM), L-15 media, Hanks' balanced salt solution (HBSS), fetal bovine serum과 그의 각종 세포배양에 필요한 보충제 (supplement)들은 Gibco Co.(Grand Island, NY)에서 구입하였고 collagenase(type Ia), trypsin inhibitor, dispase, deoxyribonuclease I(DNAase), neutral red dye(NR)등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo)에서 구입하였으며 cyclosporine A는 Sandoz Research Institute(East Hanover, NJ)로부터 제공받았다.

2. 세포분리 및 배양

세포의 분리 및 배양은 Trifillis 등¹⁰⁾의 방법을 약간 변경한 이¹¹⁾의 방법에 따랐으며 액화질소에 보관된 세포를 급속히 녹여 실험용도에 따라 다른 배양접시에 분주 배양하여 세포가 full confluence에 도달하였을때 각종 실험을 실시하였다.

3. CSA 독성 측정

14 mg의 CSA를 먼저 95% ethanol 0.5 ml에 녹인후 0.2 ml의 tween 80를 가하고 이를 6.3 ml의 찬 HBSS에 한방울씩 떨어트리면서 녹여 2 mg/ml의 농도가 되는 stock solution을 만들었다¹²⁾. 이를 배양액에 최종 농도가 25-100 ug/ml이 되도록 희석하여 confluence에 달한 96 well plate에 농도별로 0.2 ml씩 넣어 3-24시간 배양하였다. 각각의 시간에 CSA가 함유된 배양액을 씻어낸뒤 세포 생존율은 neutral red assay 방법¹³⁾ 사용하여 540 nm filter로 장착된 Multiscan titertek

*본 논문의 요지는 1990년 10월 19일 대한병리학회 제43차 추계학술대회에서 발표되었음.

*본 연구는 1990년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구 보조비로 충당되었음.

(Flow Lab. Inc.)으로 측정하였으며 각 실험군은 16내지 24 well로 구성되었고 vehicle 대조군에 대한 상대적인 비율로 표현하였다. 한편 세포외액에 존재하는 Ca^{2+} 이 CSA 독성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 MEM에 1 mM의 EGTA를 첨가하여 Ca^{2+} 이 없는 배양액을 만들어 MEM에 배양한 세포들과 함께 CSA에 대한 독성도 함께 측정하여 보았다.

2. 전자현미경 표본

전자현미경 표본을 위한 세포들은 60-mm Lux Permanox culture dish(Miles Lab., Naperville, IL)에 배양하였으며 100 ug/ml의 CSA 투여군, vehicle 투여군 및 대조군으로 나누었다. 12, 24시간에 세포들을 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 3번 세척한 뒤 3% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 전 및 후 고정을 한 뒤 알콜로 탈수하였다. propylene oxide 처리 후 propylene oxide와 epon 812가 1:1로 섞인 혼합액을 부어서 표면을 골고루 덮게한 다음 여액을 3-4시간에 걸쳐 따라버린 후 실온에서 하루동안 방치시켰다. 여기에 다시 epon 812를 부어 얇은 층을 만든 후 beam capsule의 밀면을 잘라 그위에 세운 후 여기에도 epon 812를 채운후 60°C에서 3일동안 방치하여 굳게 하였다. 이를 LKB ultramicrotome 으로 초박절편을 만들어 염색한뒤 JEOL EX1200 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 세포 생존율

신 근위세관 세포들은 일반적으로 Fig. 1에서 보는 것처럼 CSA 농도(25-100 ug/ml)와 배양시간(3-24 hr)에 따라 생존율이 감소함을 보여주었다. 그러나 배양 3시간에는 농도에 관계없이 생존율이 97-103%로 별다른 세포손상이 없었으나 농도 100 ug/ml 6시간째부터 생존율이 서서히 떨어져서 24시간에서 25 ug/ml은 75.9%, 50 ug/ml은 43.1%, 100 ug/ml에서는 27%정도였었다. 그러나 각각의 성적의 변동이 컸었는데 이는 세포가 실험 동물에서 얻은 inbred가 아닌 나이나 성별 및 모든 것이 서로 다른 사람에서 얻은 세포임으로 CSA에 대한 개체차가 크기 때문이라 여겨진다. 한편 세포외액에 존재하는 Ca^{2+} 이 CSA 독성에 미치는 영향을 알아보기 위한

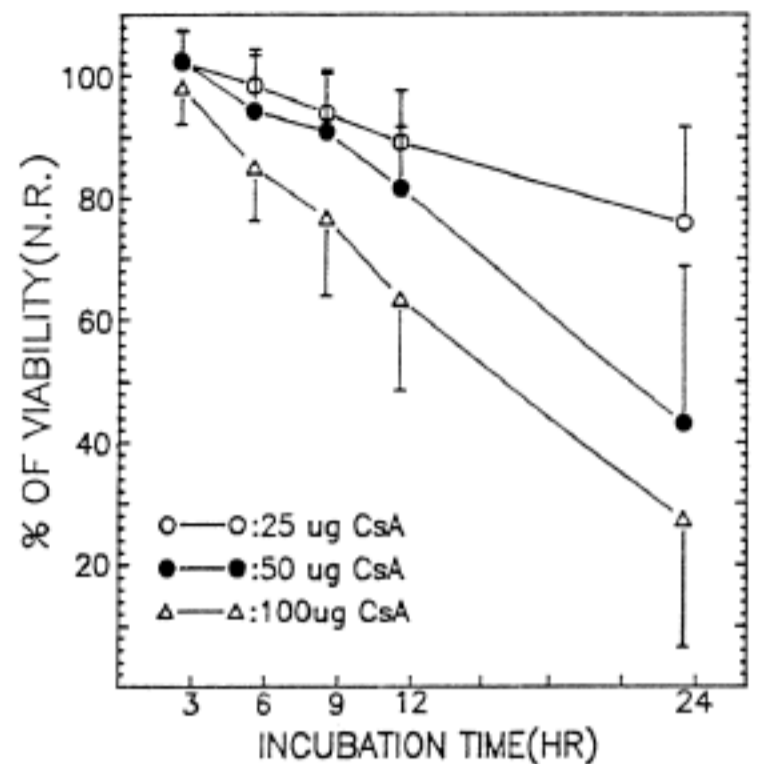


Fig. 1. Cyclosporine toxicity on cultured human renal proximal tubular cells determined by neutral red assay (NR). The results were the means \pm SEM of 11 experiments, and were expressed as percent of vehicle control values.

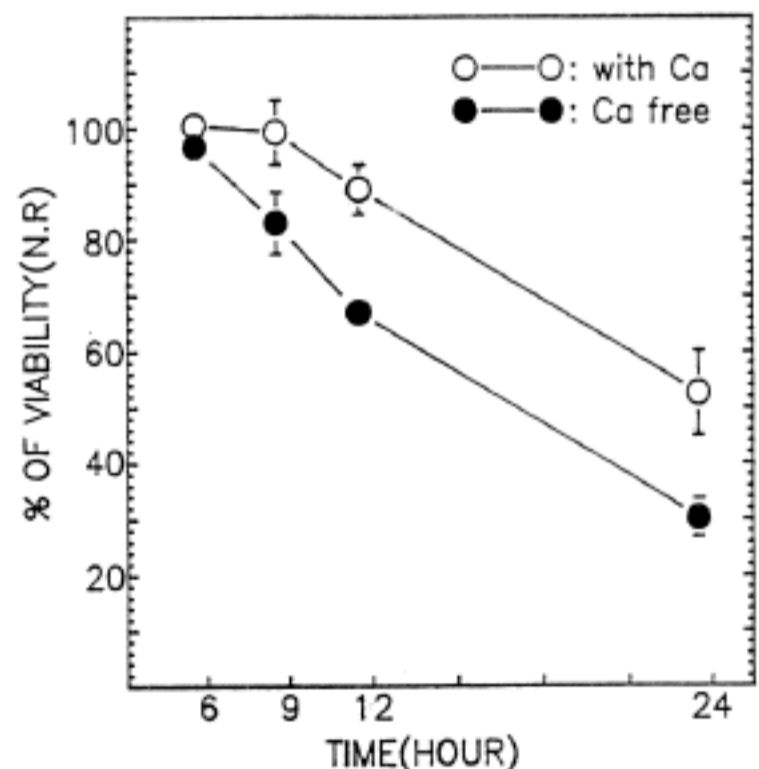


Fig. 2. Effects of calcium on cyclosporine toxicity determined by neutral red assay (NR). Cultured human renal proximal tubular cells were incubated for up to 24 hours in media containing 50 ug/ml cyclosporine and in the presence or absence of 1.8 mM calcium. The results were the means \pm SEM of 4 experiments, and were expressed as percent of vehicle control value.

실험에서는 Fig. 2에서 보는 것처럼 세포외액에 Ca^{2+} 이 없을때 훨씬 독성이 컸다.

2. 전자현미경적 소견

1) 대조군 세포 : 대부분의 세포는 원형 또는 타원형의 핵을 가진 세포질이 풍부한 세포들이었다. 이러한 세포들은 이웃 세포들과 밀접하게 배열하여 간혹 desmosome도 관찰되었으며 이웃세포와 인접하지 않은 면에는 많은 미세융모를 가지고 있었다. 사립체는 대부분

길고 날씬하였으며 규칙적으로 배열하고 있는 능들을 관찰할 수 있었다. 그외 세포내 소기관들 예를 들면 ER, Golgi체, 미세사 혹은 미세관등도 비교적 잘 발달되어 있었고 특히 일렬 혹은 나선상으로 배열된 polyribosome들이 매우 풍부하여 활동적으로 자라고 있는 세포임을 알 수 있었다(Fig. 3).

핵은 균일하게 분포하고 있는 이염색질 때문에 전체적으로 밝게 보였으며 1-2개의 잘 발달된 핵소체를 가지고 있었다. 이상의 소견으로 이 세포들은 비록 조직절편에

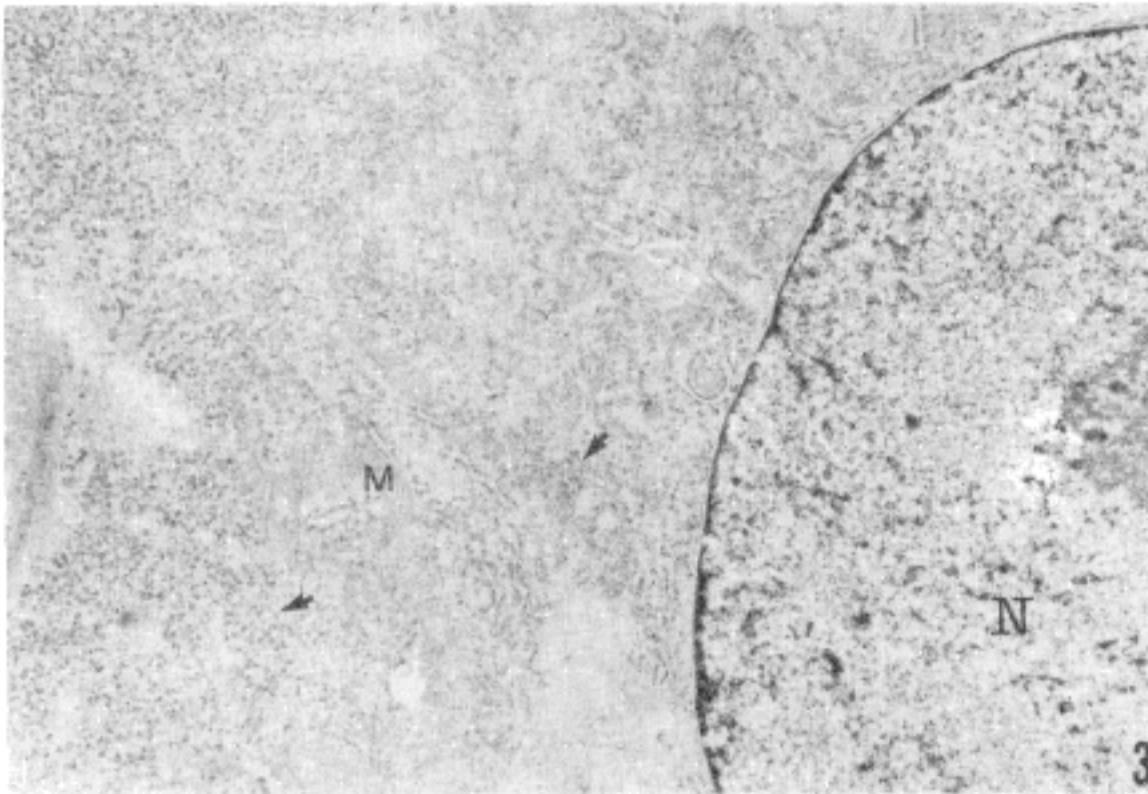


Fig. 3. Representative micrograph of control cultured human proximal tubular cell. Note abundant polyribosomes that arranged linear or spiral in shape in the cytoplasm (arrow) ($\times 22,000$).



Fig. 4. Micrograph of vehicle control group. Note several tiny lipid droplets (L) in the cytoplasm ($\times 20,000$).

서 볼 수 있는 잘 발달된 brush border나 basal infolding, 혹은 lateral labyrinth 등은 보이지 않았지만 많은 미세용모와 특징적인 사립체모양으로 미루어 활동적으로 자라고 있는 전형적인 신 근위세관세포임을 알 수 있었다.

2) vehicle 처치세포 : 처치시간에 관계없이 세포질내에 지방적을 관찰할 수 있었으나 그 수는 많지가 않았으며 배양시간에 따라 증가하지는 않았으나 vehicle 자체도 세포에 어느정도 손상을 줌을 관찰할 수 있었다. 그

러나 그외의 세포내 소기관들에서는 별다른 소견들이 관찰되지 않았다(Fig. 4).

3) CSA 처치세포 : 가장 주된 변화는 세포내의 많은 지방적 축적이었다. 거의가 electron lucent 하며 막에 싸여 있지않은 포화지방산이 주로 핵 근처에 위치하는 경향이 있었다. 많은 lamellated body가 여기저기 흩어져 있었고 선상 또는 나선상으로 배열하고 있던 polyribosome과 rER에 붙어 있던 ribosome의 분산 및 탈락과 숫적 감소로 인해 세포 전체가 밝게 보였다. 간혹 핵

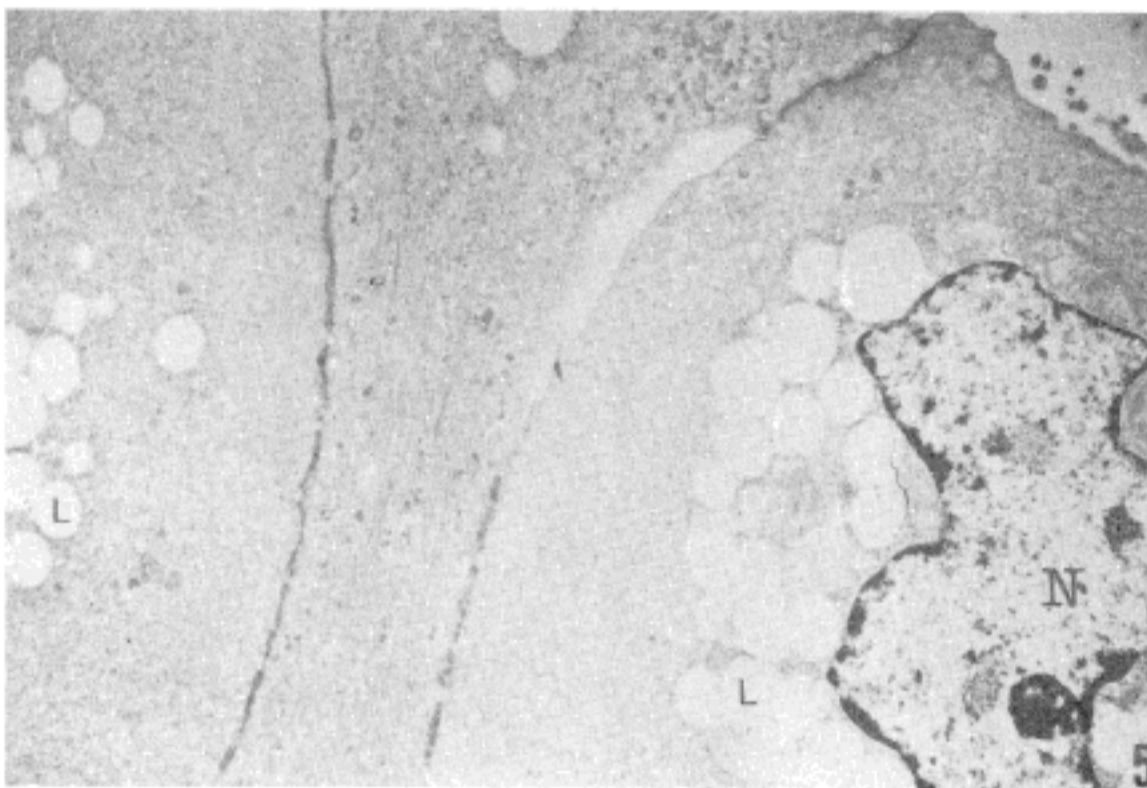


Fig. 5. Micrograph of cultured human renal proximal tubular cell after 12 h exposure to 100 ug/ml CSA. Note numerous non-membrane bound lipid vacuoles (L) and polyribosomal dispersion ($\times 18,000$).

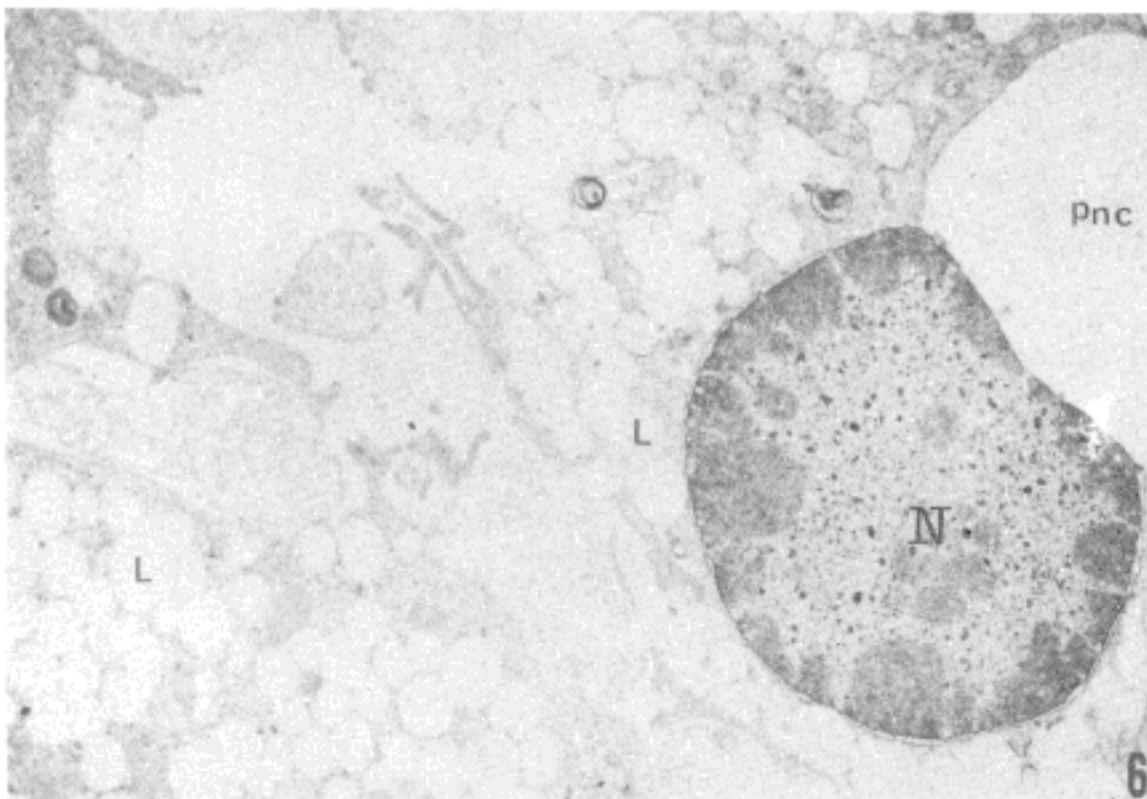


Fig. 6. Micrograph of cultured human renal proximal tubular cell after 24 h exposure to 100 ug/ml CSA. Note Massive accumulation of lipid vacuoles (L) in the cytoplasm. Nucleus revealed margination of heterochromatin with perinuclear cisterna dilatation (Pnc) ($\times 20,000$).

소체가 응집되어 있는 것이 관찰되기도 하였으나 전형적인 핵소체분리는 관찰되지 않았고 대부분의 핵소체는 활동적으로 자라고 있음을 나타내는 망상으로 배열하고 있었다. 사립체에서는 별다른 변화가 관찰되지 않았으며 *in vivo* 실험에서 관찰되던 거대사립체들도 관찰되지 않았다. 그외의 변화들로는 이 염색질들의 변연화, ER 및 perinuclear cisterna의 팽대등이 간혹 관찰되었으며 결국 세포는 세포막이 파괴되면서 죽어갔다. 이러한 소견들은 12시간군과 24시간군 사이에 특별히 차이나는 것은 아니었고 단지 양적인 차이 뿐이었다(Fig. 5, 6).

고 찰

CSA에 의한 신독성은 잘 알려져 있으나 이것이 CSA의 직접적인 신독성 때문인지에 대해서는 아직도 이론이 분분하다. Nield 등⁷⁾은 토끼에 CSA를 투여하면 전신성 Schwartzman 반응과 유사하게 혈관 내피세포 손상, 모세관 혈전, 사구체 경색등을 관찰할 수 있었다고 하며 Murray 등⁸⁾은 renal vascular resistance가 증가하여 신장에 허혈성 손상을 주기 때문이라 주장하고 있으며 또한 혈관 확장제 효과가 있는 prostaglandin을 투여하면 신손상을 줄일 수 있다고 주장하고 있다. 그러나 이것만으로는 CSA가 신장에 주로 독성을 나타내는 이유를 설명하기에는 부족하다고 여겨진다. 저자는 이러한 외적요인을 제거하기 위하여 사람 신장에서 근위세관 세포들을 분리 배양하여 여기에 직접적으로 CSA를 노출시켜 본 결과 투여양과 시간에 비례하는 독성을 관찰할 수 있었고 형태학적으로도 *in vivo*에서 관찰된 것과 같은 유사한 소견들을 관찰할 수 있어서 적어도 일부는 CSA가 신장 특히 근위세관 세포에 직접적인 독성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 12시간군이나 24시간군에서 표준편차가 큰 것은 실험상의 잘못이 아니라 실험대상이 *inbred strain*이 아닌 나이와 성별 그리고 모든 조건이 다른 사람이기 때문에 오는 개체차 때문이라 여겨진다. 본 실험에서 사용하였던 CSA 양이 치료 적정양보다 훨씬 많았던 것이 큰 결점이나 그것은 *in vitro* 실험 성격상 배양세포들은 재생능력이 빨라서 적은양의 독성물질에 오랜동안 노출시킨다면 독성물질에 의해 죽은 세포가 떨어져 나간다고 하더라도 그 주위의 세포가 재빨리 증식하여 빈공간을 메워 버림으로써 생존을 검사에 나타나지 않는 결점과 full confluence를 지나 계속 세포

를 배양시키면 세포의 활성도가 떨어지므로 생길 수 있는 잘못 때문에 어쩔 수 없었다.

한편 이¹¹⁾는 ³H-CSA를 이용하여 사람 신 근위세관 세포에서 세포외액에 Ca²⁺이 없을때 CSA의 세포내 흡수 정도가 세포외액에 Ca²⁺이 있을 때보다 훨씬 증가한다고 주장하고 있다. 이러한 소견은 본 연구에서 관찰한 세포외액에 Ca²⁺이 없을때 훨씬 독성이 증가하는 소견과 연관이 있다고 할 수 있겠다. 다시 말해서 Ca²⁺이 없을때 CSA가 훨씬 많이 세포내에 축적됨으로써 더 많은 독성을 나타낸다고 여겨진다.

전자현미경소견상 많은 지방적은 다른 사람들이 *in vivo* 실험에서 관찰한 소견과 잘 일치하였으나 세포질내에 polyribosome의 숫적감소와 함께 정상적으로 일렬 또는 나선상으로 배열하고 있던 polyribosome의 분산이 관찰되었다. 이는 형태학적으로 세포에 필요한 단백질 합성능의 저하를 의미하여 이에 따라 세포내 지질을 세포밖으로 배출하기 위해 필요한 apoprotein의 합성이 억제됨으로써 지질이 세포내에 축적된다고 여겨진다. Boelsterli 등¹⁴⁾과 Cole 등¹⁵⁾은 각각 쥐 간 배양세포 및 신 배양세포에서 CSA(10⁻⁶ M, 1 ug/ml)를 투여한 결과 세포전체의 단백질 합성능의 저하와 함께 분비능이 감소함을 보였으며 이러한 소견은 저자들이 관찰한 형태학적 소견과 일치한다고 할 수 있겠다. 이러한 polyribosome의 분산은 cisplatin¹⁶⁾이나 aflatoxin B1¹⁷⁾등의 투여후에도 관찰되는데 이때는 반듯이 핵소체 분리를 동반하고 있어서 이러한 약제들은 핵소체 DNA로부터 ribosomal RNA로의 전사를 방해해서 온다고¹⁸⁾ 잘 알려져 있으나 CSA 투여때는 전형적인 핵소체 분리가 잘 보이지 않아 세포질내로 들어온 CSA가 직접적으로 polyribosome이나 rER에 붙어 있는 ribosome들을 분산시키는 것 같다고 여겨진다.

맺 음 말

저자는 CSA가 직접적으로 신장에 독성을 나타내는가를 알아보기 위해 사람 신 근위세관 세포를 분리배양하여 *in vitro*에서 신독성 및 형태학적 변화를 추구해본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 배양한 사람 신 근위세관 세포에 대한 CSA의 독성은 neutral red assay 방법에서 농도(25-100 μg/ml) 및 노출시간(3-24시간)에 비례해서 증가함을 보고 CSA

가 신장에 직접적인 독성이 있음을 알았고 세포 외액에 Ca^{2+} 이 없을 경우에는 독성이 더욱 증가함을 보았다.

2) 전자현미경 소견상 세포질내에 많은 지방적의 증가와 함께 rER에 붙어있는 ribosome이나 polyribosome의 분산 및 숫적 감소를 보여 CSA가 신 근위세관 세포에 단백질합성능을 억제함으로 독성을 나타낸다고 사료된다.

3) 사람 신 근위세관 세포를 분리 배양해서 사용한 *in vitro* model은 CSA 독성 검사에 유용함을 알았다.

이상의 결과로 CSA는 신장에 직접적인 독성도 있음을 알았고 그 기전은 CSA에 의한 세포내 단백질합성능의 저하로 생각되며 세포외액에 존재하는 Ca^{2+} 농도 또는 Ca^{2+} channel등과 CSA의 세포내 흡수등과의 관계등 그 기전에 대해서는 더욱 추구해보아야 되리라 여겨진다.

참 고 문 헌

- 1) Krönke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Stall F, Gallo RC, Waldmann TA, Green WC: *Cyclosporine A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. Proc Natl Acad Sci USA 81:5214-5218, 1984*
- 2) Shaw J, Meerovitch K, Elliot JF, Bleakly RC, Paetkau V: *Induction, suppression and superinduction of lymphokine mRNA in T-lymphocytes. Mol Immunol 24:409-419, 1987*
- 3) Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB, Strom TB: *Cyclosporine; a new immunosuppressive agent for organ transplantation. Ann Int Med 101:667-682, 1984*
- 4) David CW, Lau KW, Hwang WS: *Cyclosporine toxicity on cultured rat microvascular endothelial cells. Kid Inter 35:604-613, 1989*
- 5) Dieperink H, Starklint H, Kemp E, Leyssac PP: *Comparative pathophysiology and histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. Transpl Proc 20(3):785-791, 1988*
- 6) Myers BD: *Cyclosporine nephrotoxicity. Kid Inter 30:964-974, 1986*
- 7) Nield GH, Rocchi G, Imberti L, fumagalli F, Brown Z, Remuzzi OG, Williams DG: *Effects of cyclosporine on prostacyclin synthesis by vascular tissue in rabbits. Transpl Proc 15:2398-2400, 1983*
- 8) Nield GH, Ivory K, Williams DG: *Glomerular throm-*

- bi and infarction in rabbits with serum sickness following cyclosporine therapy. Transpl Proc 15: 2782-2786, 1983*
- 9) Murray BM, Paller MS, Paller MS, Ferris TF: *Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. Kid Inter 28:767-774, 1985*
- 10) Trifillis AL, Regec AL, Trump BF: *Isolation and culture and characterization of human renal tubular cells. J Urology 133:324-329, 1985*
- 11) 이정용 : 신 근위세관세포의 Cyclosporine A 흡수양상. *대한병리학회지 24(4):(in publication), 1990*
- 12) Borel JF, Feurer C, Magmee C, Stähelin H: *Effects of the new anti-lymphocytic cyclosporin A in animal. Immunology 32:1017-1025, 1977*
- 13) Borrenfreund E, Puerner JA: *Toxicity determined in vitro by morphological alteration and neutral red absorption. Toxicol Lett 24:119-124, 1985*
- 14) Boelsterli UA, Bouis P, Brouillard JF, Donatsch P: *In vitro toxicity assessment of cyclosporine A and its analogs in primary rat hepatocyte culture model. Toxicol Appl Pharm 96:212-221, 1988*
- 15) Cole E, Cheung F, Wong PY, Fung LS, Skorecki K, Levy GA: *Toxic effects on renal cell in culture: A comparison of cyclosporine A and its metabolites. Transpl Proc 21(1):943-945, 1989*
- 16) Jones TW, Chopra S, Kaufman JS, Flamenbaum W, Trump BF: *Cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced acute renal failure in the rat. correlation of structural and functional alterations. Lab Invest 52: 363-374, 1985*
- 17) Cole KE, Hsu IC, Trump BF: *Comparative ultrastructural effects of aflatoxin B1 on mouse, rat, and human hepatocytes in primary culture. Cancer Res 46:1290-1296, 1986*
- 18) Simard R, Bernhard W: *The phenomenon of nucleolar segregation; Specific action of certain antimetabolites. Int J Cancer 1:463-479, 1966*

— Abstract —

Cyclosporine Toxicity on Cultured Human Renal Proximal Tubular Cells

Jung Young Lee, M.D.

Department of Pathology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Nephrotoxicity is the most common dose-limiting

factor of cyclosporine A (CSA) in clinical usage. But the mechanism of CSA-induced nephrotoxicity still remains unresolved. Many authors insisted that CSA induced renal proximal tubular cell injury is due to the secondary effects following hemodynamic changes or endothelial cell damage, instead of direct toxicity by CSA.

To find out that CSA has a direct toxicity to the proximal tubular cells, the author used primary cultures of human proximal tubular cells to eliminate the hemodynamic or endothelial influences that could be produced in *in vivo* model.

In the present study, the viability against CSA was tested by the neutral red assay method with modulation of Ca^{2+} amount in incubating media and observed electron microscopically.

The viability test showed direct toxic effect of CSA on human proximal tubular cells and this was enhanced by Ca^{2+} depletion in incubating media. Morphologically noted are accumulation of lipid droplets and polyribosomal dispersion, which may be association with inhibition of cellular synthetic activity. These results suggest the toxicity is a direct effect of cyclosporine and that toxic mechanism may be due to inhibition of cellular synthetic activity. And this experiment also showed that primary cultures of human renal proximal tubular cells can be a good *in vitro* model for investigating CSA nephrotoxicity.

Key Words: Cyclosporine, Nephrotoxicity, Kidney, Cultured cell