

## 신 근위세관 세포의 Cyclosporine A 흡수양상\*

가톨릭 의과대학 병리학교실

이 정 용

### 머 리 말

강력한 면역 억제제로써 장기이식 거부반응이나 자가 면역질환에 널리 사용되고 있는 Cyclosporine A (CSA) 는 *Tolypocladium inflatum*과 같은 진균류의 많은 대사산물중 하나로써 11개의 아미노산으로 구성된 cyclic peptide 이다<sup>1)</sup>. 이는 지질친화성 때문에 별다른 수용체 도움없이도 쉽게 세포내로 들어가서<sup>1)</sup>  $Ca^{2+}$  결합단백인 calmodulin<sup>2,3)</sup>이나 cyclophilin<sup>4,5)</sup>과 결합하여 세포내에 존재하게 된다고 한다. 그러나 이러한 CSA도 모든 세포에 균일 하게 잘 흡수가 되는 것이 아니라 흉선, 임파절, 비장같은 면역기관이나 간, 신장등의 조직과 친화성이 크다고하며<sup>6)</sup> 이러한 친화성이 면역 억제효과와 함께 이 약제의 부작용인 신독성 및 간독성과 연관이 있을 것이라 여겨진다. 이러한 점에서 CSA의 흡수 정도와 세포손상과는 밀접한 관계가 있는 것 같으나 CSA에 대한 kinetics 연구는 Burkitt 림프종 세포인 RAJI 세포나<sup>7)</sup> 토끼 신장 세포에 대한 연구<sup>8)</sup> 밖에 없고 사람 신장 세포에 대한 정보는 전혀 없는 상태이다.

한편  $Ca^{2+}$  channel blocker인 verapamil (VP)의 투여는 장기이식 수여자에서 CSA에 의한 신독성을 줄여준다고 하나<sup>9-11)</sup> 아직 정확히 어떤 기전으로 일어나는지에 대해서는 잘 모르고 있다. 그러나 Sumpio등<sup>12)</sup>은 VP에 의한 CSA의 신독성 감소는 신 근위세관 세포에 대한 직접적인 효과가 아니라 혈류역동학적으로 GFR과 신혈류를 향상시키기 때문이라고 주장하고 있다.

이에 저자는 Sumpio등이 주장하고 *in vivo* 연구 model에서 있을 수 있는 혈류역동학적 효과 및 그외의

영향을 배제하기 위하여 사람 신 근위세관 세포를 분리 배양하여 *in vitro* 실험 model로 사용하였으며 여기서 사람 신 근위세관 세포에 의한 CSA흡수양상을 알아보고 또한 VP, Ca ionophore 및  $Ca^{2+}$ 농도의 변화가 CSA흡수에 어떤 영향을 미치나 알아 보고자 본 실험을 계획하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

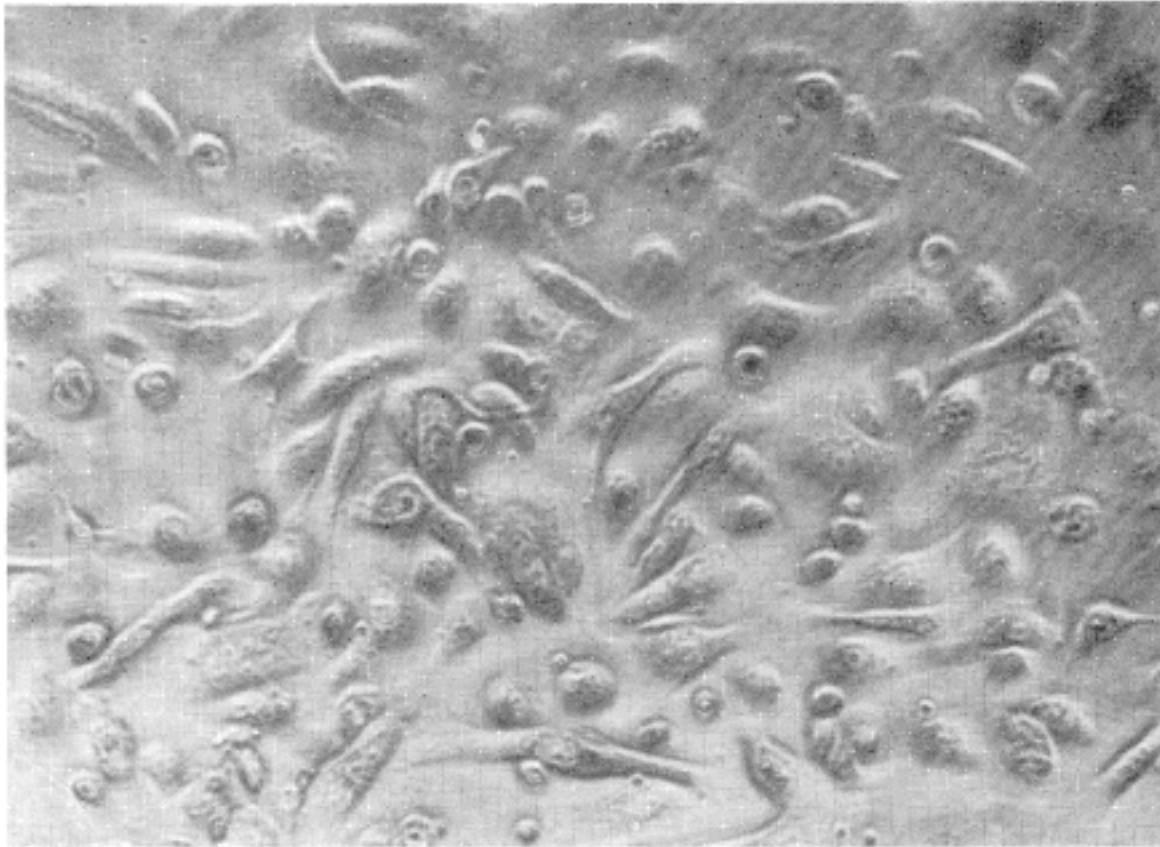
Eagle's minimum essential medium (MEM), L-15 media, Hanks' balanced salt solution (HBSS), fetal bovine serum과 그의 각종 세포배양에 필요한 보충제 (supplement)들은 Gibco co. (Grand Island, NY)에서 구입하였고 collagenase (type Ia), trypsin inhibitor, dispase, deoxyribonuclease I (DNAase) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo)에서 그리고 CSA 및 <sup>3</sup>H-CSA (15.5 mCi/mg) 등은 Sandoz Research Institute (East Hanover, NJ)에서 구입하였다.

#### 2. 세포분리 및 배양

신 세포암이나 외상으로 인해 적출된 신장을 L-15 배양액에 담아 hood로 옮긴후 무균적으로 신장 크기 및 무게를 측정하고 사진촬영을 한뒤 육안소견을 서술한후 정상부위 일부를 절단하고 나머지는 10% 중성 포르말린에 고정후 임상병리과로 돌려주었다. 세포 분리 및 배양은 Trifillis<sup>13)</sup>등의 방법을 약간 변경하여 사용하였으며 그 방법을 간단히 기술하면 아래와 같다. 절단한 정상부위 신장은 피막을 제거한 다음 찬 HBSS로 여러번 세척한 다음 피질부만을 칼로 빗어내었다. 이들을 다시 잘게 썰어 digestion solution (HBSS, 100 U/ml collagenase, 1 mg/ml dispase, 50  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor and 10 U/ml DNAase)에 부유시켜 magnetic stirrer가 있는

\*본 논문의 요지는 1990년 10월 19일 대한병리학회 제43차 추계학술대회에서 발표 되었음.

\*본 연구는 1990년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구 보조비로 충당되었음.



**Fig. 1.** Monolayers of cultured human proximal tubular cells (X 200, inverted microscope).

spinner flask에 옮겨 37°C에서 약하게 돌렸다. 그후 상층액만 조심스럽게 모은 다음 digestion solution을 제거하기 위해 MEM (Eagle's minimum essential medium, 15 mM HEPES, 1.2 gm/L sodium bicarbonate, 100 ug/ml gentamycin) 으로 부유시켜 400 rpm에서 3분동안 원심분리하여 상층액은 버렸다. 이러한 과정을 3번 반복하여 세관들이 풍부한 pellet을 얻었다. 이를 complete media (10% fetal calf serum이 보충된 MEM) 에 부유시켜 75 cm<sup>2</sup> culture flask에 분주하여 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며 full confluence에 도달할 때까지 3내지 4일에 한번씩 배양액을 갈아주었다. Full confluence에 도달한 flask는 Ca<sup>2+</sup>이 없는 찬HBSS로 세척한 후 trypsin-EDTA로 약 3분간 처리하여 세포들을 부유시켰으며 이들을 complete media로 trypsin의 반응을 정지시켰다. 세포들은 HBSS로 3번 세척한 뒤 1 flask당 7% DMSO가 포함된 complete media 1 ml에 부유시켜 cryovial (Nunc C0, Denmark제)에 분주한 후 -4°C 및 -70°C를 거쳐 액화 질소에 보관하였다. 매 실험때 필요한 만큼의 cryovial을 급속히 녹여 24 well에 분주 배양하여 세포가 full confluence에 도달하였을때 각종 실험을 실시하였다.

### 3. CSA 흡수 검사

<sup>3</sup>H-CSA (15.5 mCi/mg) 을 ethanol과 tween 80 녹

인 1 mM CSA가 0.5-10 uM이 되게 HBSS에 희석시켜 사용하였다. Full confluence에 도달한 24 well plate (Fig.1) 를 HBSS로 씻어 낸다음 농도 별로 투여하여 1-60분 동안 37°C에서 배양한 후 각각의 시간에 반응을 중지시키기 위해 찬 HBSS를 넣은 후 다시 여분의 CSA를 없애기 위해 같은 HBSS로 여러번 씻어 내었다. 여기에 0.2 N NaOH를 0.5 ml넣고 하루동안 실온에서 방치한 다음 300 ul를 취해 counting vial에 옮기고 5 ml의 Ready solv scintillation cocktail을 넣은 다음 Beckman B counter로 측정하였으며 각 well에서 다시 100 μl를 취해 단백질을 Lowry방법<sup>14</sup>으로 측정하여 결과는 p mole/mg protein으로 표시하였다. 세포외에 존재하는 Ca<sup>2+</sup>농도가 CSA 흡수에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 1 mM EGTA를 함유한 HBSS, 1.8 mM의 Ca<sup>2+</sup>를 함유한 HBSS 및 2.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 함유한 HBSS에서 CSA 흡수 정도도 측정해 보았으며 또한 Ca<sup>2+</sup> channel blocker 인 VP와 Ca<sup>2+</sup> ionophore 인 A23187이 CSA 흡수에 미치는 영향도 아울러 관찰하였다.

## 성 적

### 1. CSA 흡수양상

시간경과에 따른 CSA의 흡수는 농도 (0.5-10 uM)가

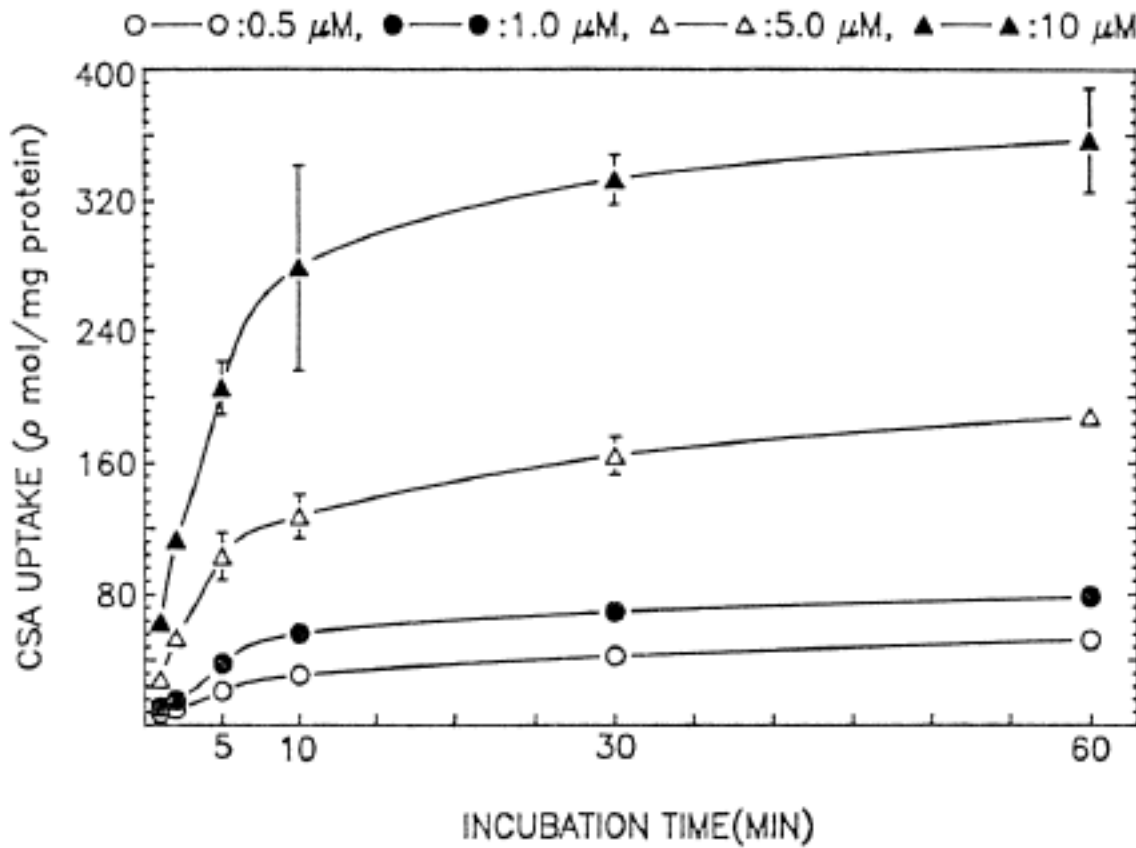


Fig. 2. Time course of CSA uptake by human proximal tubular cell at different concentrations of CSA. The results were the means  $\pm$  SEM of 4 experiments.

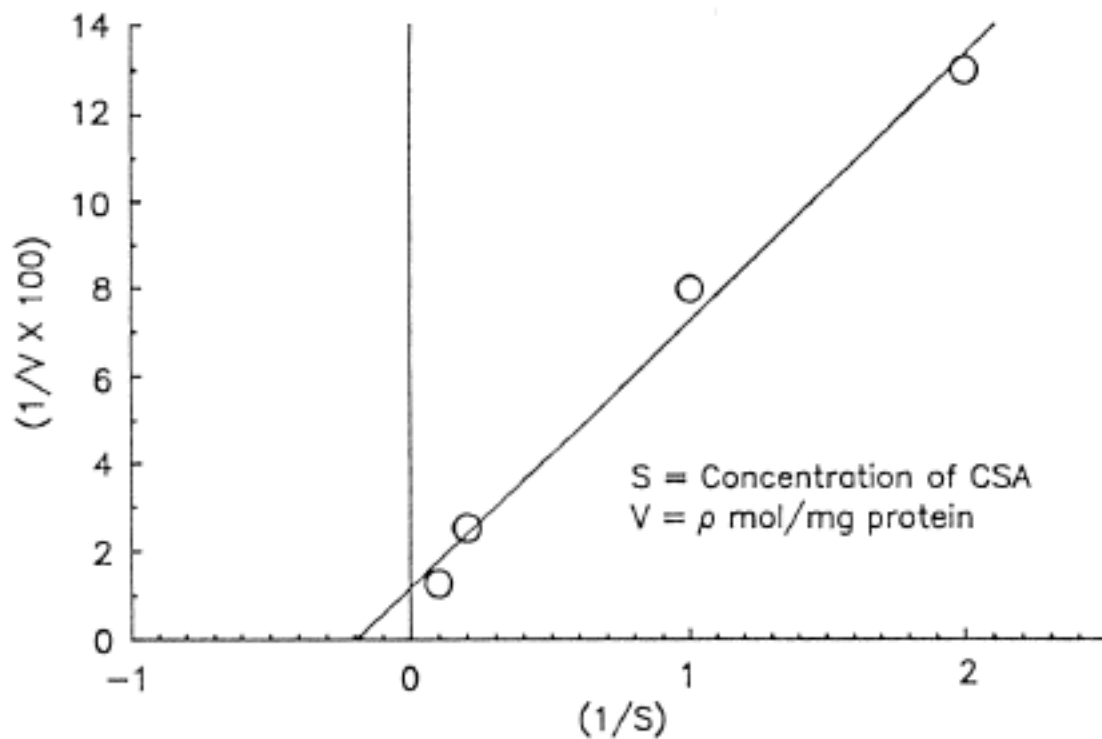


Fig. 3. Double reciprocal plot of CSA concentration versus initial rate of CAS uptake. Uptake values at 1 min incubation time from the data presented in Fig. 1.

높아 질수록 신 근위세관 세포에 의한 흡수량이 증가하였으며 각농도에서 보면 첫 5분내에 급속한 증가를 보이다가 10분까지는 서서히 증가하였으며 10분 이후 부터는 거의 평형을 이루고 있었다(Fig. 2). Fig. 2에서 1분 때의 각 CSA농도와 신 근위세관 세포에 의한 CSA 흡수 양간의 관계를 double reciprocal plots로 표시하고 이를 linear regression 분석을 한 결과(Fig. 3) 최고의 흡수속도 절반을 나타내는 Michaelis-Menten 상수<sup>15</sup>인

Km 값은 5.6  $\mu$ M 이었고 최고의 흡수값 Vmax는 86.2 p moles/mg cell protein/min의 값을 구하였다.

## 2. Ca<sup>2+</sup> 의 영향

한편 세포 외액에 존재하는 Ca<sup>2+</sup>양의 변화가 CSA 흡수에 미치는 영향을 알아보기 위해 Ca<sup>2+</sup> free HBSS (1 mM EGTA 첨가), 아무 처치하지 않은 HBSS (1.8 mM Ca<sup>2+</sup>), 그리고 Ca<sup>2+</sup>을 첨가해 2.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 함

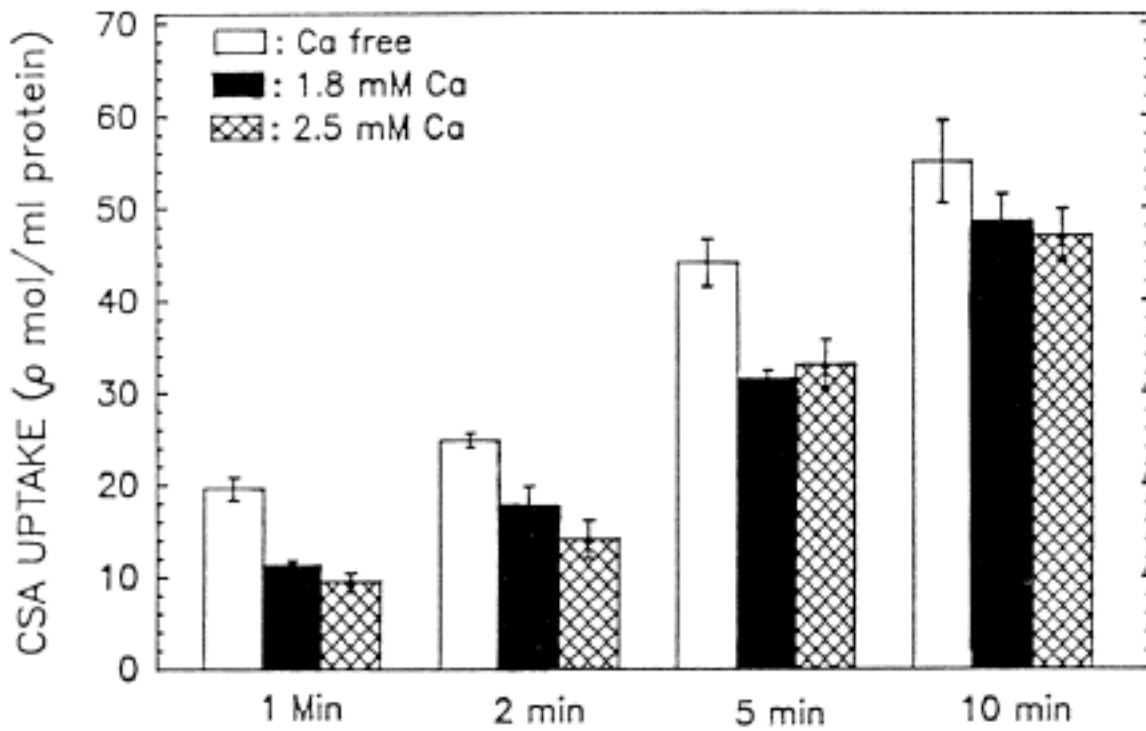


Fig. 4. Effect of calcium in incubating media on CSA uptake at 1  $\mu$ M concentration by human proximal tubular cells. The results were the means  $\pm$  SEM of 3 experiments.

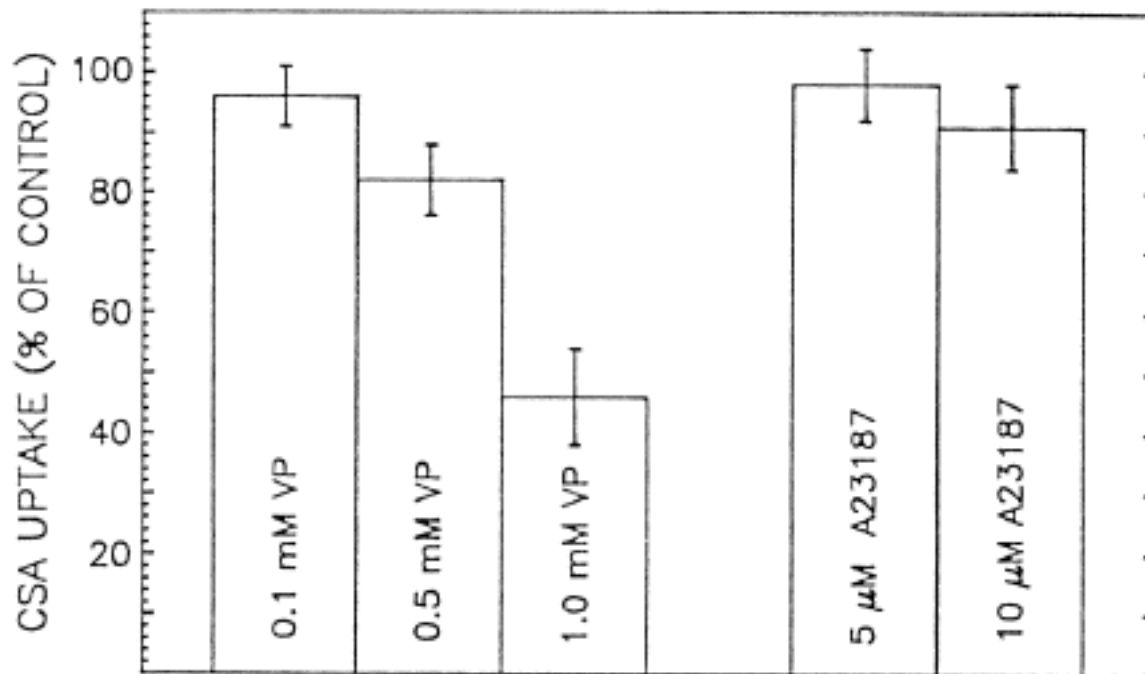


Fig. 5. Effect of calcium transport modulators on CSA uptake at 1  $\mu$ M concentration by human proximal tubular cells. The results were the means  $\pm$  SEM of 4 experiments, and were expressed as percent of control value.

유한 HBSS에서 1  $\mu$ M CSA 투여후 시간별(1-10분)로 CSA 흡수양을 측정해본 결과 세포외액에  $Ca^{2+}$ 이 없을 때는  $Ca^{2+}$ 이 있는 군보다는 모든 시간군에서 의미있는 CSA 흡수양의 증가를 보였으나 2.5 mM  $Ca^{2+}$ 군과 정상군과의 차이는 없었다(Fig. 4)

### 3. VP의 영향

Ca channel blocker 인 VP (0.1-1.0 mM)와 Ca ionophore 인 A23187 (5, 10 mM) 을 1분간 전처리 한뒤 1 mM의 CSA를 넣어주고 CSA 흡수양상에서 급속한 증가가 끝나는 5분대를 선택하여 각각 CSA 흡수양을 비교해 본 결과 0.5 mM VP, 1.0 mM VP군에서 각각 대조군 보다 82% 및 46%로 CSA의 흡수를 억제하였으

나 A23187에 의해서는 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig. 5)

## 고 찰

CSA는 지질친화성 성격 때문에 세포내로 들어갈때는 수동적인 단순확산<sup>16)</sup>으로 들어와서 세포내 calmodulin<sup>2,3)</sup>이나 cyclophilin<sup>4,5)</sup>등과 결합하여 세포내에 존재한다. 그러나 모든 세포에 균일하게 친화성이 있는것은 아닌것 같으며 주로 림파계나 간 또는 신장에 높은 농도를 보인다고 한다<sup>6)</sup>. 임상적으로도 이러한 친화성이 높은 장기에서 주로 신독성 또는 간독성과 같은 이약제의 부작용을 보이는 것은 이들 세포에서의 CSA흡수정

도와 세포손상과는 밀접한 관계가 있으리라 여겨지며 세포종류나 실험동물에 따라 CSA의 흡수율이 다른 것으로<sup>5, 8)</sup> 미루어 사람 신 근위세관 세포의 흡수양상도 규명되어야 한다고 여겼다. 본 연구에서는 사람 신 근위세관 세포에서 CSA 흡수 양상이 농도(1-10  $\mu$ M)와 노출 시간에 따라 쌍곡선 양상으로 증가하는 것을 볼 수 있었고 근위세관 세포와의 친화성을 나타내는 Km값은 5.6  $\mu$ M로 Nagineni<sup>8)</sup>등이 토끼 신 근위세관 세포에서 측정한 5.1  $\mu$ M과 비슷하였으나 Vmax값은 86.2 p moles/mg cell protein/min로서 Nagineni<sup>8)</sup>등이 측정한 47 pmoles/10<sup>6</sup> cell/min와는 기본단위가 달라서 비교해 볼 수가 없었다.

최근 장기이식을 받은 환자에서 CSA의 투여와 함께 Ca<sup>2+</sup> channel blocker를 투여하면 면역 억제기능에는 별다른 영향없이 신독성이 감소 된다는 보고가<sup>9-11)</sup> 있으며 Sumpio<sup>12)</sup>등은 VP 전처치가 CSA에 의한 신독성을 억제하는 이유를 신 근위세관 세포에 대한 직접적인 효과가 아니라 GFR과 신혈류를 향상시키기 때문이라고 주장하고 있다. 그러나 이러한 환자들에서 순환 CSA양을 측정해 본 결과 비슷한 양의 CSA만을 투여한 대조 환자군보다 월등히 증가하는데 그 이유는 VP가 CSA와 손에 관여하는 cytochrome p-450 효소계에 경쟁적으로 작용하여 억제하기 때문이거나 CSA pharmacokinetics를 억제하기 때문<sup>17)</sup>이라고 한다. 본 연구에서는 VP가 CSA에 의한 신독성을 오히려 증가시키는 것으로 보아<sup>18)</sup> VP의 신독성에 대한 억제 작용은 CSA의 세포내 흡수 억제로 일어 난다고 여겨지며, 본 연구에서와 같이 A23187 (stimulator of Ca<sup>2+</sup>-2H<sup>+</sup> exchanger)에 의해서는 별다른 영향이 없었으나 세포외액에 Ca<sup>2+</sup>이 없을 때 더욱 많은 CSA가 세포내로 들어가는 것을 볼 때 근위세관 세포의 세포막에서 CSA의 운반 또는 결합 장소와 Ca<sup>2+</sup> channel 사이에 서로 밀접한 관계가 있거나 Ca<sup>2+</sup> channel을 통해서 세포내로 들어갈 가능성도 배제하지 못한다고 생각된다. 그러나 높은 농도의 Ca<sup>2+</sup> (2.5 mM) 이 세포외액에 존재할 때 CSA의 흡수가 감소 되지 않은 것은 일반적으로 세포내 Ca<sup>2+</sup> 양이 10<sup>-7</sup> M 정도로 아주 낮게 유지되고 있으나 세포 바깥의 Ca<sup>2+</sup> 양이 1.8 mM에서 2.5 mM로 증가한다고 해서 세포 내외의 Ca<sup>2+</sup> 농도의 차이가 크게 변하였다고 할 수 없기 때문에 CSA 흡수에 별다른 영향을 미치지 못하였다고 여겨진다.

세포내에 들어온 CSA가 구체적으로 세포내 어디에 존재하는지를 밝히기 위해 현재 EM autoradiography를 진행중에 있으며 세포내에서 어떤 기전으로 세포에 손상을 주는지에 대해서는 좀더 추구해 보아야 할 것이다.

## 맺 음 말

저자들은 <sup>3</sup>H-CSA를 이용하여 배양한 사람 신 근위세관 세포에서 CSA 흡수양상을 알아보고 세포 외액에 존재하는 Ca<sup>2+</sup> 양의 변화(0~2.5 mM), VP(0.1-1.0 mM) 및 A23187(5, 10 mM) 등이 CSA 흡수에 어떤 영향을 미치는가에 대한 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 사람 신 근위세관 세포에 의한 CSA 흡수양상은 농도(0.5-10  $\mu$ M)와 노출시간(1-60분)에 따라 5분까지는 급상승을 보이고 10분까지는 서서히 그리고 10분후에는 거의 변화가 없는 쌍곡선 양상으로 증가하였다.
- 2) 신 근위세관 세포의 CSA에 대한 Km (Michaelis-Menten constant) 값을 5.6  $\mu$ M이었고 Vmax는 86.2 p mol/mg cell protein/min이었다.
- 3) 세포외액에 Ca<sup>2+</sup>이 없을 때는 정상(1.8 mM) 또는 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> 상태 때보다 신근위세관 세포에 의한 CSA 흡수양이 증가하였다.
- 4) VP 전처치로 인한 신 근위세관 세포의 CSA 흡수양상은 0.5, 1.0  $\mu$ M에서 각각 대조군의 82% 및 46%로 억제되었으나 A23187의 전처치는 아무런 영향이 없었다.

이상의 결과로 사람 신 근위세관 세포에서 CSA 흡수양상을 알 수 있었고 Ca<sup>2+</sup> channel blocker는 CSA 흡수를 억제하고, 세포외액에 Ca<sup>2+</sup>이 없을 때는 CSA 흡수가 증가하는 것으로 미루어 CSA는 세포내로 들어갈 때 Ca<sup>2+</sup> channel을 통하거나 또는 Ca<sup>2+</sup> channel과 아주 밀접한 연관이 있는 것 같으며 Ca<sup>2+</sup>과 CSA는 Ca<sup>2+</sup> channel에서나 calmodulin과의 결합에 있어서 경쟁적으로 작용할 가능성이 있다고 여겨진다.

## 참 고 문 헌

- 1) Borel JF: *The cyclosporines. Transpl Proc* 21:810-815, 1989
- 2) Colombani PM, Robb A, Hess AD: *Cyclosporin A*



- Binding to calmodulin; A possible site of action on T lymphocytes. Science* 228:337-339, 1985
- 3) Wells MS, Vogelsang GB, Colombani PM, Hess AD: Cyclosporin A binding to calmodulin. *Transpl Proc* 21:850-852, 1989
  - 4) Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ: Cyclophilin; A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226:544-546, 1984
  - 5) Merker MM, Handschumacher RE: Uptake and nature of the intracellular binding of cyclosporin A in a murine thymoma cell line, BW5147. *J Immunol* 132:3064-3070, 1984
  - 6) Atkinson K, Boland J, Britton K, Biggs J: Blood and tissue distribution of cyclosporine in humans and mice. *Transpl Proc* 15:2430-2433, 1983
  - 7) Fabre I, Fabre G, Lena N, Cano JP: Kinetics of uptake and intracellular binding of cyclosporine A in RAJI cell, in vitro. *Biochem Pharm* 35:4261-4266, 1986
  - 8) Nagineni CN, Lee DBN, Misra BC, Yanagawa N: Cyclosporine-A transport in isolated renal proximal tubular cells; inhibition by calcium channel blockers. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1226-1230, 1988
  - 9) Wagner K, Albrecht S, Neumayer HH: prevention of delayed graft function in cadaveric kidney transplantation by a calcium antagonist. preliminary results of two prospective randomized trials. *Transpl Proc* 18:510-515, 1986
  - 10) Wagner K, Neumayer HH: Influence of the calcium antagonist diltiazem on delayed graft function in cadaveric kidney transplantation; Results of a 6-month follow-up. *Transpl Proc* 19:1353-1357, 1987
  - 11) Wagner K, Henkel M, Heinemeyer G, Neumayer HH: Interaction of calcium blocker and cyclosporine. *Transpl Proc* 20:561-568, 1988
  - 12) Sumpio B, Baue AE, Chaudry IH: Treatment with verapamil and adenosine triphosphate-MgCl<sub>2</sub> reduces cyclosporine nephrotoxicity. *Surgery* 101:315-322, 1987
  - 13) Trifillis AL, Regec AL, Trump BF: Isolation, culture, and characterization of human renal tubular cells. *J Urology* 133:324-329, 1985
  - 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
  - 15) Lehninger AL: principles of biochemistry. 5th edition

- New York NY, Worth publication Inc, 1987, p212
- 16) LeGrue SJ, Frieman AW, Kahan BD: Binding of cyclosporine by human lymphocytes and phospholipid vesicles. *J Immunol* 131:712-718, 1983
  - 17) Renton KW: Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by the calcium channel blockers diltiazem and verapamil. *Biochem Pharm* 34:2549-2553, 1985
  - 18) Jensen CWB, Flechner SM, Van Buren CT, Frazier OH, Cooley DA, Lober MI, Kahn BD: Exacerbation of cyclosporine toxicity by concomitant administration of erythromycin. *Transplantation* 43:263-270, 1987

— Abstract —

### Kinetics of Cyclosporine uptake on Cultured Human Proximal Tubular Cells

Jung Young Lee, M.D.

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

Cyclosporine A (CSA), a lipophilic cyclic undecapeptide, is not accumulated evenly in all tissues and has a high affinity to several tissues such as lymphoid organs, liver, and kidneys. From this point of view, it is reasonable to assume that the amount of CSA uptake would be correlated with the extent of cell injury. On the other hand, verapamil, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, has been shown to ameliorate CSA nephrotoxicity. Since proximal tubule is the major site of drug transport and CSA toxicity, the author has studied the nature of CSA uptake and its interaction with verapamil in isolated human renal proximal tubular cells.

The CSA uptake rapidly increased over the first 5 min and then achieved almost steady-state after 10 min at all concentrations (0.5-10 uM). Kinetic analysis yielded that the Km and Vmax values of CSA were 5.6 uM and 86.2 p mol/mg cell protein/min, respectively. And Ca<sup>2+</sup> depletion in media enhanced CSA uptake significantly but verapamil reduced it.

These results suggest that the Ca<sup>2+</sup> channels and CSA transporting sites on cell membrane are closely associated and that Ca<sup>2+</sup> and CSA might be taken up competitively by proximal tubular cells.

**Key Words:** Cyclosporine A, Verapamil, Kidney, Cultured cell