

UW용액에 보존된 쥐의 신장에서의 ICAM-1의 변화

고려대학교 의과대학 외과학교실

김남렬 · 민연기 · 강석형 · 엄준원 · 조민영 · 이재복 · 최상용 · 서성욱 · 구범환 · 황정웅 · 정석인

Expression of ICAM-1 in the Preserved Rat Kidney

Nam Ryeol Kim, M.D., Youn Ki Min, M.D., Seok Hyung Kang, M.D., Jun Won Um, M.D., Min Young Cho M.D., Jae Bok Lee, M.D., Sang Yong Choi, M.D., Sung Ock Suh, M.D., Bum Hwan Koo, M.D., Cheung Wung Whang, M.D. and Suk In Jung, M.D.

Purpose: Prolonged cold ischemia has been shown to be an important factor in the development of post-transplant renal dysfunction. The exact mechanisms have not been completely defined. The expression of ICAM-1 (CD-54) in rat kidneys stored at 0, 4, 12, 24 and 48 hours in University of Wisconsin (UW) solution was studied in an attempt to correlate ischemia time with increased immunogenicity of the graft.

Methods: Kidneys from male Lewis rats were perfused with UW solution, removed and bathed in UW solution at 4°C for 4, 12, 24, and 48 hours respectively. For the evaluation of expression of ICAM-1, immunohistochemical staining, Western blotting and RT-PCR were performed.

Results: Immunohistochemical staining in normal non-ischemic kidneys revealed that glomerular capillaries expressed ICAM-1 but that tubular cells did not. The preserved kidneys were analyzed with immunohistochemistry, Western blotting and semi-quantitative RT-PCR and showed increased transcription and expression of ICAM-1 in the cortex of the kidney. This expression reached a maximum at 24 hours and declined at 48 hours. The ICAM-1 protein expression in the preserved kidney cortex was increased at 4 hours (1.68 ± 0.60 fold of control kidneys, ($p=0.06$)), 12 hours (2.38 ± 0.90 fold, ($p=0.02$)), 24 hours (3.70 ± 1.29 fold, ($p=0.01$)), and 48 hours (2.00 ± 0.54 fold, ($p=0.01$)). The mRNA expression (the ratio of ICAM-1/GAPDH) in preserved kidneys cortex relative to control kidneys was increased at 4 hours (1.19 ± 0.14 fold of control kidneys), 12 hours (1.38 ± 0.16 fold),

24 hours (1.77 ± 0.29 fold), and 48 hours (1.19 ± 0.12 fold) ($p<0.05$ for all time points).

Conclusion: We conclude that cold preservation of rat kidneys in UW solution induces increasing levels of ICAM-1 cell surface expression and gene transcription. This increase in adhesion molecule expression can be a contributing factor in the development of post-transplant renal dysfunction by increasing the immunogenicity of the graft. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:1-7)

Key Words: ICAM-1, Renal transplantation, Cold ischemia
중심 단어: ICAM-1, 신장 이식, 냉허혈

Department of Surgery, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

서 론

사체를 이용한 신이식에 있어서의 문제점은 신이식 수술 후 생체 신이식보다 수술 후 지연형 신기능 장애 (delayed graft dysfunction)가 많이 발생할 수 있으며, 이러한 신기능의 이상은 수술 후 환자에게 많은 문제점을 가져 올 수 있다. 즉 더 많은 투석을 요구하게 되고 소변량의 감소와 크레아티닌의 증가로 인한 합병증이 증가할 수 있다. 따라서 이러한 신기능의 장애로 환자의 병원 입원 기간이 길어지고 투석으로 인한 경제적 부담이 가중된다. 이렇게 신이식 수술 후 소변량이 적은 핍뇨(oliguria)는 생체 신이식의 경우 10%로 보고하고 있으나, 뇌사자의 사체 신이식의 경우 많게는 25~50%까지 보고하고 있다.(1-3) 이렇게 생체 신이식과 사체 신이식이 차이가 나는 것은 아마도 사체 신이식의 경우 공여 신장을 장시간 차가운 보존용액에서 보존하기 때문이라고 믿어진다. 즉 장시간의 냉허혈시간이 이러한 문제를 일으킨다고 추론할 수 있다. 하지만 구체적으로 어떠한 요인이 이러한 문제를 발생시키는지에 대해서는 아직 확실하게 밝혀진 것이 없다. 이러한 원인이라고 설명할 수 있는 요인으로는 장시간의 냉허혈시간, 허혈-재관류 손상 그리고 수술 전에 감각이 많이 된 경우로 추론하여 볼 수 있다.(2) 최근 염증반응에 깊이 관여한다는 보고들이 많은 adhesion molecule 중의 하

책임저자 : 정석인, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
☎ 136-705, 고려대학교 의과대학 부속 안암병원 일반
외과
Tel: 02-920-5364, Fax: 02-928-1631
접수일 : 2001년 6월 9일, 게재승인일 : 2001년 6월 21일

나인 ICAM-1 (CD54)은 immunoglobulin superfamily에 속하며 혈관내피세포, 상피세포 그리고 백혈구에서 표현된다.(4,5) 세포매개성 염증과 면역반응에 있어서 혈관에서 순환하는 백혈구와 혈관내피세포와의 상호반응은 중요한 필수적인 반응이다. 소위 adhesion molecule이라 불리는 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)과 endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), 그리고 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 등이 염증반응 부위에 증가되어 있다는 보고들이 있다.(6) 허혈 자체는 공여신장의 혈관들에 다양한 염증을 일으키며 또한 급성 거부 반응시에 tubular cell에서 ICAM-1이 증가되는 것을 보고하고 있다.(7-11) 저자들은 장기간 동안 장기를 차가운 보존액에 두었을 때 ICAM-1이 증가하며 허혈-재관류 손상이 아닌 냉허혈시간 그 자체가 ICAM-1 유전자와 단백질의 증가를 가져올 수 있다는 가설을 세웠다. 이 연구는 임상적으로 이식 후에 발생할 수 있는 신기능 장애가 이러한 염증반응에 의하여 발생할 수 있다는 것을 밝혀내고 이것을 임상에 적용한다면 공여 신장의 기능향상을 가져오는 데 이바지 할 수 있을 것으로 생각된다.

방 법

1) 실험재료

실험동물은 12주된 수컷 Lewis계 흰쥐를 사용하였으며, 실험동물들은 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 사육하였으며, 실험 기간 중 사료는 시판고정사료를 먹여 사육하였다. 실험동물은 수술 전 24시간 동안 금식을 시켰으며, 마취는 Metofane (methoxyflurane, Mallinckrodt Veterinary)을 사용하여 마취하였다. 복부는 털을 제거하고 알코올을 사용하여 소독을 하였다. 신장절제는 복부 중앙 절개로 복부를 연 다음 복강 내에 열음을 집어 넣었다. 신동맥 상부의 대동맥을 겸자로 폐쇄시킨 뒤에 신동맥 하부의 대동맥을 이용하여 UW용액으로 3~5분 동안 관류를 하였다. 양측 신장은 절제 후 4°C UW용액에 4시간, 12시간, 24시간 그리고 48시간 동안 각각 보존하였다.

2) 면역조직화학염색

면역조직화학염색을 위하여 절제한 신장을 정중 절개하여 두 부분으로 나눈 뒤에 4% paraformaldehyde 용액에 보존한 뒤에 30% sucrose 용액에 12시간 동안 보존하였다. 그 후에 -75°C 냉장고에 조직을 보관하였다. 냉장된 조직을 $6\mu\text{m}$ 로 박절한 뒤에 슬라이드에 부착시킨 뒤에 염색을 시작하였다. 먼저 3% H_2O_2 에 반응시켜 내재된 peroxidase의 활동을 저지시키고 avidin과 biotin 억제 용액 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 사용하였다. 그 뒤에 조직을 정상 말혈청(1 : 20, Vector)에 50분 동안 25°C 에서 배양시켰다. 그 뒤에 마우스의 단클론항체(anti-

rat ICAM-1 antibody, clone 1A29, Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 1 : 50으로 배양시켰다. 그 뒤에 biotinylated horse antimouse antibody (1 : 150, Vector)를 이차항체로 1시간 동안 25°C 에서 반응시켰다. 그 뒤에 avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase system (Vector)에 30분 동안 반응시킨 뒤에 발색을 위하여 diaminobenzidine color development (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 반응시킨 뒤에 hematoxylin으로 30초 동안 대조염색을 하였다. 흐르는 물로 씻고 crystal mount로 봉입하였다. 대조군으로 같은 양의 murine monoclonal antibody (mouse IgG 1K isotype control, Pharmingen)를 이용하여 염색을 하였다. 양성인 tubuli를 고배율 시야($\times 400$)에서 세었다.

3) Western blotting

절제한 신장을 피질과 수질로 분리하여 피질 조직을 실험에 사용하였다. 분리된 피질을 차가운 버퍼(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 g/ml leupeptin, 1% Triton X-100, 0.2% NaN_3)에 10 : 1 비율로(vol/wet weight) 섞은 뒤 즉시 tissue homogenizer를 이용하여 조직을 잘게 부렸다. 잘게 간 조직을 12,000 G에서 10분 동안 원심분리를 한 뒤에 상층액을 모았다. 또한 세포막에 있는 단백질을 얻기 위한 다른 방법으로 조직을 차가운 분리 용액(250 mM sucrose, 10 mM triethanolamine, 1 g/ml leupeptin, 0.1 mg/ml PMSF)에서 갈았다. 간 조직을 17,000 G에서 10분 동안 그리고 200,000 G에서 60분 동안 (Beckman ultracentrifuge with Ti-80 rotor) 원심분리하였다. 이 plasma membrane이 많이 포함된 펠렛을 ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 g/ml leupeptin, 1% Triton X-100, 0.2% NaN_3)에서 재용해 시켰다. 총 단백질의 정량 분석을 위하여 총 단백질농도는 단백질 분석키트(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 측정하였다. 남아있는 용액에 샘플버퍼를 넣은 뒤에 100°C 에서 3분 동안 가열을 한 뒤 -75°C 에 보존하였다. 전기영동은 6% polyacrylamide mini-gel을 이용하였다. 젤은 0.1% Coomassie blue R250으로 염색을 하여 단백질 밴드를 가시화시켜 총 단백질 정량을 위하여 사용하였다. 단백질을 nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 Bio-Rad transfer기구(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 전원하였다. nitrocellulose membrane을 5% nonfat dry milk에 반응시키고 ICAM-1 monoclonal antibody (Serotec Ltd, Oxford, UK)에 1 : 250으로 반응시킨 뒤에, 1 : 1,000으로 antimouse secondary antibody horseradish peroxidase (Amersham)를 반응시켰다. 면역반응 밴드를 enhanced chemiluminescence method (SuperSignal CL-HRP Substrate System; Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 조사하였다. 이렇게 가시화된 밴드

를 Bio-Rad imaging 덴서티미터(Hercules, CA, USA)이용하여 정량화 하였다. 단백질이 de novo protein synthesis인지를 구별하기 위하여 Cycloheximide를 1 mg/kg 복막으로 투입하였다. 싸이클로헥사마이드는 단백질 생성을 억제시키는 약물로 신절제술 2시간 전에 주입하였다.(12)

4) RT-PCR

RNA는 모두 Chomczynski-Sacchi의 표준 방법에 의해 추출하였다.(13,14) 우선 절제된 신장에서 피질을 분리한 후 RNA 용해성 buffer (TRIzol) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 RNA를 추출하는데 chloroform을 첨가한 후 원심분리를 하여 얻어진 수상 층을 isopropanol과 반응시켜 얻어진 침전물에서 RNA를 분리하였고 이렇게 추출된 RNA를 260 nm의 흡광도에서 분광광도계로 정성 분리하였다. RNA의 integrity는 agarose겔을 이용한 전기영동으로 28S와 18S ribosomal RNA를 관찰하였다.

cDNA의 합성은 SuperScript II RT (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하였는데 이는 0.5 µg oligo (dT) primer와 3 µg의 전체 RNA와의 반응으로 시작하여 이 반응 혼합물을 70°C에서 10분간 배양과 얼음 위에서 냉각을 거친 후 이 반응혼합물 7 µl (2 µl 10X PCR buffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT)를 각각의 RNA 혼합물에 첨가한 후 42°C에서 5분간 배양하였다. Superscript II RT 200 U을 이 반응 혼합물에 첨가한 후 다시 42°C에서 50분간 배양한 후 70°C에서 15분간 가열한 후 냉각을 시킨다. 여기에 RNase H 2 unit을 각 시험관에 첨가 후 37°C에서 20분간 배양을 시켰다. 역전사의 양성 대조 반응은 제조회사에서 제공하는 control RNA로 하고 음성 대조 반응을 위하여 동량의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 물을 이용하여 추출된 효소를 이용하였다. 포화 실험을 시행한 결과 전체 RNA의 양이 각 반응에서 3 µg 이 되어야 RT-PCR이 포화됨을 알 수 있었다.

Rat ICAM-1에 대한 염기 서열 특이 시발체(Operon Technologies, Alameda, CA, USA)를 고안하였는데 sense primer의 염기서열은 (5-GGG TTG GAG ACT AAC TGG A-3)이고 antisense primer의 서열은 (5-GCA GCG CAG GAT GAG GTT CTT-3)이었다. Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)가 준 정성 RT-PCR을 위한 내부 대조 유전자로 사용되었다. 이 GAPDH sense primer의 서열은 (5-AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA-3)이고 anti-sense primer의 서열은 (5-ATA CTG TTA CTT ATA CCG ATG-3)이었다. 역전사 과정 후에 5 unit의 Taq polymerase (Perkin Elmer Co, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. 전체 반응량은 각 반응 시험관에 각 100 µl이었으며 모든 증폭과 혼성반응은 DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Co, Norwalk, CT, USA)에서 시행되어졌다. 94°C에서 1분간 30회 전후 60°C에서 1분간, 그리고 72°C

에서 1분간 처치 후 72°C에서 10분간 최종 배양을 시행하였다.

증폭 과정 후에 각 PCR 생성물 15 µl씩을 ethidium bromide로 처리된 2% agarose 겔에서 전기영동 시켜 분리하였고 그 겔은 Polaroid 필름(Cambridge, MA, USA)으로 현상한 후 정량분석을 위하여 Bio-Rad imaging densitometer (GS-700)로 그 발현 밴드를 스캔하였다. 동일한 cDNA로부터 증폭 분리된 ICAM-1과 GAPDH에 대한 PCR 생성물은 동일한 겔에서 전기영동 처리를 하여 각 겔과 필름 사이의 편차를 없애기 위한 ICAM-1/GAPDH 비를 구하였다.

5) 통계 분석

모든 데이터 처리와 분석에는 Statview (Cricket Software Inc, Philadelphia, PA, USA)가 이용되어졌으며 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결 과

1) 면역조직화학염색

ICAM-1은 대조군의 신장의 혈관 내피세포에서는 모두 발현되었지만 세뇨관에서는 표현되지 않았거나 매우 약하게 표현되었다. ICAM-1 up-regulation은 보존된 신장의 근위 세뇨관에서 발현되었음을 나타내었고 특히 brush border에서 제일 강하게 표현되었다(Fig. 1). 염색 결과 양성인 tubuli를 고배율 시야(×400)에서 세었는데(Fig. 1) 4시간, 12시간, 24시간 보존 신장에서의 ICAM-1 발현은 점차 증가하며 48시간 보존 신장에서 다시 감소되었다(Fig. 2).

2) Western blotting

ICAM-1 단백질의 western blot 분석 결과 ICAM-1의 발현이 24시간 보존 신장까지는 시간이 지남에 따라 점차

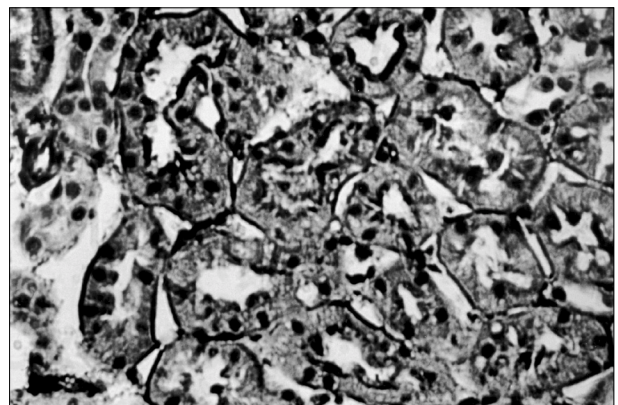


Fig. 1. Immunohistochemical staining. ICAM-1 upregulation was detected in proximal tubuli after kidney had been preserved with the greatest staining at the brush border (×400).

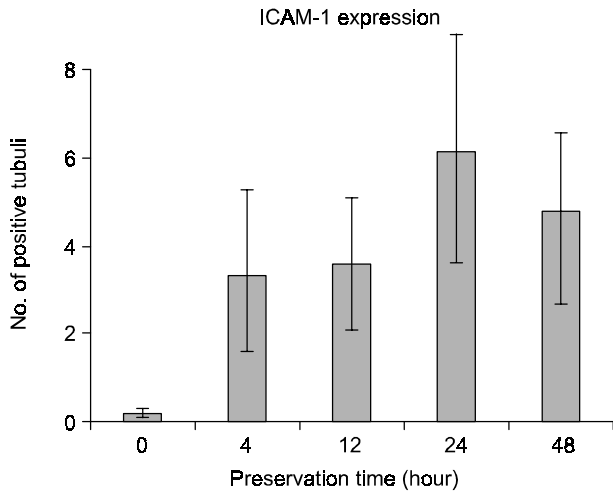


Fig. 2. The ICAM-1 expression (the number of positive tubuli per high-power visual field) increased in kidneys over 4, 12, and 24 hours, and decreased at 48 hours.

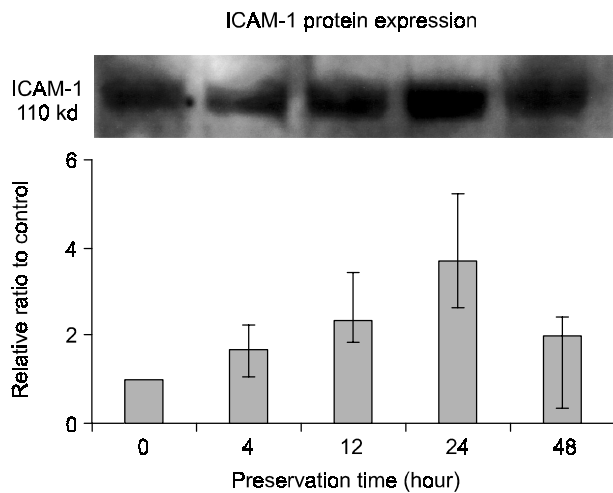


Fig. 3. Western blotting of ICAM-1 protein expression. There is a progressive increase in ICAM-1 protein expression up to 24 hours after which it decreases at 48 hours.

증가함을 보였으며 48시간 신장에서 다시 감소하였다. 대조군의 신장에서 보다 4°C UW용액에 일정기간 보존된 신장의 피질에서 ICAM-1 단백질의 발현이 증가하였는데 4시간 보존 신장이 대조군보다 1.68 ± 0.60 배, 12시간 보존 시에 2.37 ± 0.90 배, 24시간 보존 시에 3.70 ± 1.29 배, 48시간 보존된 신장은 2.00 ± 0.54 배의 증가를 보였다(Fig. 3). 이중 12시간, 24시간, 48시간 보존된 경우에서 통계적으로 의미 있는 증가를 보였다($p=0.02$, $p=0.01$, $p=0.01$). 이러한 ICAM-1 단백질의 증가된 발현이 단백질의 신생 합성에서 기인한 것인지를 알아보기 위하여 신 절제 2시간 전에 실험쥐의 복강내로 cycloheximide를 주사하였고 이러한 처치는 ICAM-

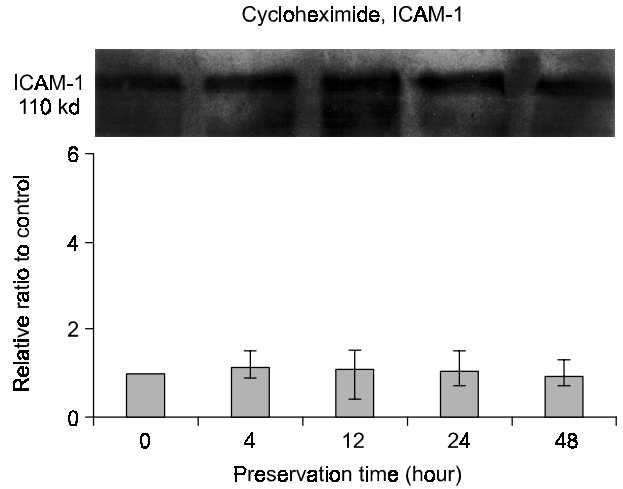


Fig. 4. Western blotting of ICAM-1 protein in the presence of cycloheximide. Rats were injected intraperitoneally with cycloheximide two hours prior to nephrectomy. This treatment inhibited the upregulation to the ICAM-1 expression. The ICAM-1 expression in the preserved kidneys cortex relative to control kidneys was nearly same at 4 hour (1.15 ± 0.25 fold of control kidneys), 12 hours (1.07 ± 0.23 fold), 24 hours (1.06 ± 0.40 fold), and 48 hours (0.94 ± 0.81 fold).

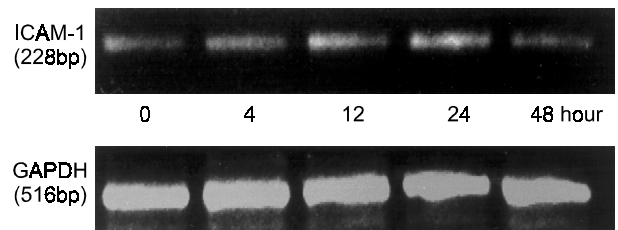


Fig. 5. The mRNA expression of ICAM-1 in the preserved kidney cortex relative to control kidneys were increased at each time point after control with a peak at 24 hours (above). The mRNA of GAPDH were nearly same with control kidney (below).

1 발현의 upregulation을 억제하였다(Fig. 4).

3) RT-PCR

UW용액에서 보존된 신장의 피질에서의 mRNA 발현은 대조군의 신장에서 보다 4시간(1.19 ± 0.14 배), 12시간(1.38 ± 0.16 배), 24시간(1.77 ± 0.29 배), 48시간(1.19 ± 0.12 배) 보존된 신장에서 모두 증가되었다($p < 0.05$). Glycerinaldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 밴드는 모두 대조군의 것과 대략 동일한 정도를 보여 주었다(Fig. 5). 그러므로 동일한 cDNA로부터 증폭 분리된 ICAM-1과 GAPDH에 대한 PCR 생성물은 동일한 겔에서 전기영동 처리를 하여

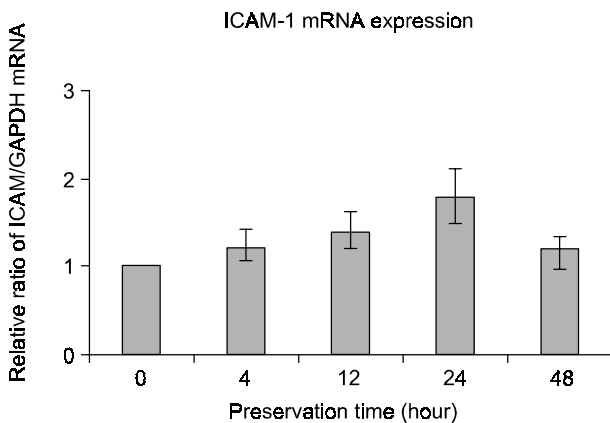


Fig. 6. Semi-quantitative RT-PCR. The mRNA expression (the ratio of ICAM-1/GAPDH) in the preserved kidney cortex relative to control kidneys were increased at each time point after control with a peak at 24 hours.

각 겔과 필름 사이의 편차를 없애기 위하여 구한 ICAM-1/GAPDH 비 또한 보존된 신장에서 모두 증가되었다($p < 0.05$)(Fig. 6).

고찰

신 이식 후에 나타나는 지연 이식 신기능 장애는 기술적인 요소와 더불어 대사와 염증 반응 문제가 원인이 되는 다양한 요소들에 기인하는 현상으로 여겨지고 있다. 이러한 신기능의 이상은 전체 이식 신장의 기능, 거부 반응 빈도 수 그리고 이식 후 투석의 필요와 그 기간에 큰 영향을 줄 뿐 아니라 전체 이식 신의 장기 생존율에도 음의 영향을 미치는 것으로 고려되고 있다. 냉허혈 시간은 이런 이식 후 신장 기능의 이상에 가장 중요한 요인의 하나로 여겨지며 여러 염증 반응과 면역학적으로 활성화된 물질들의 upregulation이 이런 신기능 이상 현상의 특성을 설명하는데 도움을 줄 것이다. 이상적인 장기 보존 용액은 이식 장기의 물리적, 생리적, 면역학적 변성을 줄여 주도록 고안되어야 하는데(15,16) 처음에 췌장 보존액으로 고안된 University of Wisconsin (UW) 용액은 곧 모든 장기 특히 사체 공여 장기의 보존에 이용되게 되었다. 허혈-재관류 손상 모델에서 ICAM-1이 upregulation된다는 많은 보고가 있다.(7-10) 인간 제대 정맥의 혈관 내피세포를 이용한 연구 결과 hypoxia와 reoxygenation이 여러 free radical을 생성시키고 또 이는 adhesion molecule 발현의 up-regulation을 유발시켜 결국 neutrophil의 접착성과 활성화를 증강시키게 된다고 한다.(17,18) 또한 이식 신장의 급성 거부반응시에 ICAM-1이 upregulation 된다는 여러 보고가 있는데(19-22) 세포 매개 거부 반응은 단핵구 세포들의 신장 조직 내로의 이동과 수여자 T세포의 TCR과 공여장기 조직

내의 MHC분자 사이의 상호작용에서 유발된 효과기 반응이라는 특성을 갖는다. 여기서 adhesion molecule들이 이러한 거부 반응의 병리 기전에서 중요한 역할을 하는 것인데 백혈구의 혈관 상피내세포로의 접착성과 TCR 항원 상호작용의 안정화가 이런 adhesion molecule들에 의하여 매개된다고 하였다.(23) Adhesion molecule들은 실험적으로 유발된 수신증이 있는 동물의 신장 피질에서 upregulation 된다고 하는데 ICAM-1이 이런 신장 피질로의 대식세포의 유입을 시발시킨다고 한다.(24) 그러나 아직까지 UW용액에서 공여 신장의 보존이 이런 adhesion molecule의 발현 정도에 미치는 영향에 대한 평가는 없었으며 adhesion molecule들과 또다른 공여장기에 관련된 여러 인자들이 이식 초기에 일어나는 일련의 과정들에 미칠 수 있는 가능한 여러 영향에 대한 많은 연구가 진행 중이다.

저자는 본 연구에서 대조군과 함께 UW용액에 각각 4시간, 12시간, 24시간, 48시간 보존된 신장의 피질에서 ICAM-1 mRNA의 upregulation과 단백질의 발현을 알아 보았다. 정상 신장의 혈관 내피세포, 보우만씨낭의 상피세포와 간질 세포에서 ICAM-1 발현을 알아보기 위하여 이 ICAM-1 특이 단클론항체를 이용한 면역조직화학 염색법을 시행(19,23)한 결과 일정기간 보존후 신장의 근위 세뇨관, 특히 brush border에서 ICAM-1 upregulation이 강하게 발현되었다. 정상 비 허혈 상태의 신장에서 ICAM-1의 발현은 지금까지 여러 연구에서 다루어 왔으며(11,19,21,25) 이들 대부분은 ICAM-1이 일관되게 신혈관 내피세포에서 표현되며 특히 사구체 모세 혈관이나 소동맥보다 간질 모세혈관이나 소정맥의 내피세포에서 강하게 나타난다고 하였다. 또한 mesangium이나 사구체 상피세포나 신 세뇨관에서는 ICAM-1이 발현되지 않는다고 한다.(26)

ICAM-1의 표현을 측정하는 여러 다른 방법들이 보고되고 있는데,(6,10,19,22,24) 본 연구에서 저자들은 면역조직화학 염색법을 이용 400배의 고배율 시야에서 양성 염색된 세뇨관의 수를 세어 계산을 하였다. 이 결과 보존 후 24시간까지는 ICAM-1의 발현이 점차 증가하고 48시간 이후에는 발현이 감소되는 것으로 나타났으며 이런 ICAM-1의 발현 감소는 허혈 상태 48시간 이후에 나타나는 극심한 세포 해리에 기인한 것으로 여겨진다. 신 피질의 immunoblotting 결과 110 KDa의 ICAM-1밴드를 나타내는데 이 실험 결과 ICAM-1 단백질 발현이 24시간까지 점차 증가하며 다시 48시간에 감소되는 것을 알 수 있었다. 이런 증가된 ICAM-1 단백질의 발현이 단백질 신생 합성에 의한 것인지를 알아보기 위하여 쥐에게서 신장 절제 전에 cycloheximide를 복강내 투여하였으며 이는 ICAM-1 단백질 발현 증가를 억제하게 된다. 미량의 mRNA를 정량하는 방법으로 RT-PCR 법이 최근 널리 인정되고 있지만 어느 한 단계에서의 작은 변이가 최종 PCR 산물에서 크게 증폭되어 나타난다는 점과 역전사과정과 PCR과정의 각 단계에

서 동일한 조건의 유지가 매우 중요하고 또 힘들다는 점이 전체 분석의 신뢰성에 영향을 줄 수 있으므로 semi-quantitative method가 이용되었다. 이런 semi-quantitative method에서는 housekeeping gene이나 구조, 기능적으로 목표 mRNA와 관계된 유전자에서 특징적인 내재 mRNA를 어떤 특이 mRNA의 상대적인 정량을 위한 표준으로 사용한 것으로(27-29) 본 연구 결과는 24시간에 최대치를 보이고 48시간에서 감소되는 ICAM-1 mRNA의 발현을 나타내었다. 이 결과는 지속되는 허혈 상태에서 ICAM-1 발현이 mRNA나 단백질 수준에서 모두 증가됨을 나타낸다.

ICAM-1이 염증 반응과 면역기전의 여러 중요한 과정에 관여하며(30) Interleukin 1 (IL-1), 종양괴사인자(TNF- α), interferon (IFN- γ) 등이 배양된 혈관 내피세포에서 ICAM-1의 발현을 증가시킨다고 한다.(31) 이는 혈관 내피세포로 백혈구의 유도와 접착을 유발시키는 기능을 한다는 지금까지 알려진 ICAM-1의 기능과 조절에 대한 사항과 더불어 냉장 보존액에서 보존되는 경우에서도 허혈 자체가 이 proinflammatory molecule의 upregulation을 야기한다는 것을 나타내며 결국 이식 후 신장 기능의 이상현상의 병리 과정에서 잠재된 중요성을 제공한다하겠다. 그러므로 이런 결과들이 여러 염증 반응 분자들이 냉허혈기에 up-regulation되고 이것이 이식 신의 자연 기능 장애 발생에 일조 한다는 가설을 뒷받침할 수 있을 것이다. 향후 이러한 냉허혈의 중요성을 확인하기 위하여 본 연구와 같은 다양하게 설정된 보존 시간 후에 이식된 신장에서의 adhesion molecule의 발현에 대한 연구와 함께 사체공여 이식과 같이 비교적 긴 시간의 냉허혈기를 거쳐 이식 될 인공 장기와 생체 공여 이식의 경우에서 이식 전 생검으로 얻어진 조직 검체의 비교로 허혈 시간과 ICAM-1 발현의 이식 후 신 기능 이상과의 연관성을 확인하는 시도로 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) Anderson CB, Sicard GA, Etheredge E. Delayed primary renal function and cadaver renal allograft results. *Surg Gynecol Obstet* 1979;149:697-702.
- 2) Belli LS, De Carlis L, Del Favero E, Civati G, Brando B, Romani F, et al. The role of donor and recipient factors in initial renal graft non-function. *Transplant Proc* 1988;20:861-4.
- 3) Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. *Lancet* 1992;340:129-37.
- 4) Rothlein R, Dustin L, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986;137:1270-4.
- 5) Dustin L, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello A, Springer A. Induction by IL 1 and interferon- γ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137:245-54.
- 6) Fuggle V, Sanderson JB, Gray WR, Richardson A, Morris J. Variation in expression of endothelial adhesion molecules in pretransplant and transplanted kidneys-correlation with intra-graft events. *Transplantation* 1993;5:117-23.
- 7) Linas L, Whittenburg D, Parsons PE, Repine E. Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: Role of oxygen metabolites and ICAM 1. *Kidney Int* 1995; 48:1584-91.
- 8) Kelly J, Williams W Jr, Colvin B, Meehan M, Springer A, Gutierrez-Ramos J, et al. Intercellular adhesion molecule renal injury. *J Clin Invest* 1996;97:1056-63.
- 9) Rabb H, Mendiola C, Saba R, Dietz R, Smith W, Bonventre V, et al. Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:67-73.
- 10) Haller H, Dragun D, Miethke Park K, Weis A, Lippoldt A, Gro V, et al. Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int* 1996;50:473-80.
- 11) Faull J, Russ R. Tubular expression of intercellular adhesion molecule-1 during renal allograft rejection. *Transplantation* 1989;48:226-30.
- 12) Levine S, Ho LD, Pasiecznik K, Coburn W. Renal adaptation to phosphorus deprivation: Characterization of early events. *J Bone Miners Res* 1986;1:33-9.
- 13) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- 14) Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993;15:532-536.
- 15) Wahlberg A, Southard H, Belzer O. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology* 1986; 23:477-82.
- 16) Swanson K, Pasaoglu I, Berkoff A, Southard H, Hegge O. Improved heart preservation with UW preservation solution. *J Heart Transplant* 1988;7:456-67.
- 17) Arnould T, Michiels C, Remacle J. Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1994;83:3705-16.
- 18) Rainger E, Fisher A, Shearman C, Nash B. Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am J Physiol* 1995;269:H1398-1406.
- 19) Bishop A, Hall B. Expression of leukocyte and lymphocyte adhesion molecules in the human kidney. *Kidney Int* 1989; 36:1078-85.
- 20) Kauppinen H, Soots A, Krogerus L, Brummer T, Ahonen J, Lautenschlager I. Different expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and activation markers MHC Class II

- and IL-2R in acute and chronic rejection of rat kidney allografts. *Transplantation Proc* 1997;29:3150-1.
- 21) Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel J, Weiss H, Hillebrand G, Burkhardt K, et al. Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 1993;55:610-5.
- 22) von Willebrand E, Krogerus L, Salmela K, Isoniemi H, Hayry P, Laakkonen M, et al. Expression of adhesion molecules and their ligands in acute rejection of human kidney allografts. *Transplant Proc* 1995;27:917-8.
- 23) Dal Canton A. Adhesion molecules in renal disease. *Kidney Int* 1995;48:1687-96.
- 24) Ricardo D, Levinson L, DeJesoph R, Diamond R. Expression of adhesion molecules in rat renal cortex during experimental hydronephrosis. *Kidney Int* 1996;50:2002-10.
- 25) Dal Canton A, Fuiano G, Sepe V, Caglioti A, Ferrone S. Mesangial expression of intercellular adhesion molecule-1 primary glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1992;41:951-5.
- 26) Lhotta K, Neumayer HP, Joannidis M, Geissler D, Konig P. Renal expression of intercellular adhesion molecule-1 in different forms of glomerulonephritis. *Clin Sci* 1991;81:477-81.
- 27) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder S, Gazdar F, et al. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7160-4.
- 28) Murphy D, Herzog E, Rudick B, Fojo AT, Bates E. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 1990;29:10351-6.
- 29) Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimotohno K. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1992;206:231-5.
- 30) Fuggle V, Koo DDH. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998;65:763-9.
- 31) Pober S, Gimbrone A Jr, Lapierre A, Mendrick L, Fiers W, Rothlein R, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986;137:1893-6.
-