

## 미세변화 신증후군 환아에서 사이클로스포린 치료 후 Osteopontin과 Transforming Growth Factor- $\beta$ 의 발현

연세대학교\* 의과대학 병리학교실, 소아과학교실\*

임범진, 김병길\*, 홍순원, 정현주

=Abstract=

### Expression of Osteopontin and Transforming Growth Factor- $\beta$ in Childhood Minimal Change Nephrotic Syndrome After Cyclosporine Treatment

Beom Jin Lim, M.D., Pyung Kil Kim, M.D.\*, Soon Won Hong, M.D.,  
Hyeon Joo Jeong M.D.

*Dept. of Pathology and Pediatrics\*, Yonsei University,  
College of Medicine, Seoul, Korea*

**Purpose** : One of the most important adverse effects of long-term cyclosporine therapy is nephrotoxicity, the morphologic changes of which include interstitial fibrosis and arteriolar hyalinization. Recently, several authors have shown that osteopontin plays an important role in the development of interstitial fibrosis by acting as a macrophage chemoattractant and stimulating the production of TGF- $\beta$  in experimental cyclosporine nephrotoxicity. However, the relationship between osteopontin and TGF- $\beta$  in humans has not been clearly documented so far. We studied the expression of osteopontin and TGF- $\beta$  in children with minimal change nephrotic syndrome treated with cyclosporine to demonstrate whether there is a relationship between cyclosporine toxicity and osteopontin expression as previously shown in animal models.

**Materials and methods** : Nineteen children (15 males and 4 females) were the subject of this study. Renal biopsies had been performed before and after the cyclosporine therapy (mean duration: 15.9 months). In 5 patients, additional biopsies were performed after completing the cyclosporine treatment (mean: 26 months). The expressions of osteopontin and TGF- $\beta$  were evaluated by immunohistochemistry in the

glomeruli and tubulointerstitium.

**Results** : Osteopontin expression was significantly increased in the glomerular mesangium and tubules after cyclosporine treatment. But there was no statistically significant increase of TGF- $\beta$  in the interstitium. There was no significant increase in tubular osteopontin and interstitial TGF- $\beta$  expression in those cases developing interstitial fibrosis after cyclosporine treatment compared with cases those not developing interstitial fibrosis. No significant changes in osteopontin or TGF- $\beta$  expression were observed in subsequent 5 biopsy samples after discontinuation of cyclosporine compared with the first follow up biopsies.

**Conclusion** : These results suggest that osteopontin is a nonspecific marker of renal injury rather than a mediator of interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity of human. (J Korean Soc Pediatr Nephrol 2002;10:142-54)

---

**Key Words** : Cyclosporine, Nephrotoxicity, Human, Biopsy

---

## 서 론

사이클로스포린(cyclosporine)은 효과적인 면역억제제로서 1983년 신장 이식 환자에서 사용되기 시작하였다. 현재 사이클로스포린의 응용 범위는 각종 장기의 이식 뿐 아니라 자가면역질환의 치료, 그리고 미세변화 신증후군(minimal change nephrotic syndrome), 국소성 분절성 사구체 경화증(focal segmental glomerulosclerosis) 등의 신사구체 질환의 치료 등으로 넓혀졌다<sup>1)</sup>.

사이클로스포린의 신독성은 임상적으로 중요하며 가장 잘 알려진 부작용이다. 사이클로스포린 신독성시 나타나는 형태학적 변화로는 간질의 섬유화, 세뇨관의 위축, 세동맥 벽의 초차양 변화, 그리고 사구체의 경화와 위

축 등이 알려져 있다<sup>2)</sup>. 소아 신증후군 환자에서 시행된 연구에서는 혈관의 변화보다 간질의 섬유화가 사이클로스포린 신독성에서 더 흔히 나타나는 현상이라 하며 그 변화의 정도는 사이클로스포린의 용량이나 혈중 농도, 치료 기간과 직접적인 연관이 없는 것으로 나타났다<sup>3)</sup>.

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )는 활성화된 대식세포로부터 분비되는 사이토카인으로서 신장의 간질 섬유화에 중요한 역할을 한다<sup>4)</sup>. 또 어떤 연구자들은 TGF- $\beta$ 가 사이클로스포린 치료에 의해 발생한 섬유화에 있어서도 역시 중요한 역할을 하고 있음을 동물실험을 통하여 밝힌바 있다<sup>5),6)</sup>. 동물실험에서 신장 간질 섬유화의 또 다른 매개물질로 알려진 것으로 osteopontin이라는 44 kDa의 인산화 단백질이 있다.

Osteopontin은 처음에는 뼈에서 분리되었으나 현재까지 내이, 뇌, 신장, 태반, 소화관, 침샘, 땀샘등의 여러 장기에서 발견되었다<sup>7)-9)</sup>. 사람의 신장에서 osteopontin은 주로 원위 세뇨관, 특히 Henle 고리의 상행각에 주로

---

접수 : 2002년 10월 2일 , 승인 : 2002년 10월 19일  
책임저자 : 정현주  
서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 병리학교실  
전화 : (02) 361-5260 FAX : (02) 362-0860  
E-mail : pathology@yumc.yonsei.ac.kr

존재하며 일부의 근위 세뇨관도 osteopontin을 발현한다<sup>10</sup>). 지금까지 알려진 osteopontin의 작용은 다양하여 골형성 조절, 종양 발생, 대식세포 침윤을 일으키는 화학주성인자, nitric oxide 합성 억제 등의 역할을 한다<sup>11</sup>). Osteopontin의 화학주성인자로서의 작용으로 대식세포가 간질로 유입되고 여기서 TGF- $\beta$ 가 분비되어 신장 간질의 섬유화가 일어난다는 가설이 제기되었다. Ophascharoensuk 등은 실험적으로 요도폐쇄를 유발한 생쥐에서 간질의 섬유화와 TGF- $\beta$ 의 발현이 osteopontin 발현의 유무와 관계 있음을 보고하였다<sup>12</sup>). 또한 Young 등<sup>13</sup>), Pichler 등<sup>14,15</sup>), Thomas 등<sup>16</sup>)은 사이클로스포린을 처치한 백서를 사용한 실험에서 간질 섬유화가 osteopontin의 발현 증가, 대식세포의 유입, 그리고 TGF- $\beta$ 의 발현과 밀접한 관계가 있음을 보고하여 osteopontin이 사이클로스포린에 의한 조직학적 변화에서도 중요한 작용을 하고 있음을 시사하였다.

사람에서 osteopontin과 TGF- $\beta$ , 그리고 사이클로스포린 간에 실험 동물에서 밝혀진 것과 같은 상관관계가 있는지 여부를 밝혀려는 연구는 지금까지 그 수가 많지 않으며 명확한 결론에 도달한 경우도 찾기 어렵다. Okada 등은 사람의 IgA 신병증에서 세뇨관의 osteopontin의 발현이 증가하고 대식세포가 유입한 후, 여기서 간질의 변화가 일어난다고 보고하였다<sup>17</sup>). 그러나 Hudkins 등은 osteopontin이 사이클로스포린 치료와 무관하게 정상 신장에서도 표현된다고 보고하여 상반된 견해를 보였다<sup>18</sup>). 따라서 본 연구에서는 사람에서 사이클로스포린과 osteopontin, 그리고 TGF- $\beta$ 의 관계를 밝히기 위하여, 사이클로스포린 투여 전과 후에 추적생검을 시행하였던 예들 중에서, 그 원인 질환이 미세변화 신증후군(minimal change nephrotic syndrome)이었던 환자를 대상으로 하였다. 치료 전 생검 조직

을 대조군으로 삼고, 치료 후 생검 조직이 사이클로스포린 처치의 효과를 반영하는 비교군의 역할을 하게 하여, 이들 각각에서 osteopontin과 TGF- $\beta$ 의 발현을 측정함으로써 사람에서도 동물에서 관찰된 것과 같은 상관관계가 있는가를 검증하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

연세대학교 세브란스 병원 소아과에서 신장 생검을 통하여 미세변화 신증후군으로 진단 받고 일정 기간 경구 사이클로스포린 투여를 시행한 후 1.5개월 내(평균 18.6일)에 추적 생검을 시행하였던 증례 중 조직의 보존 상태와 크기가 분석에 알맞은 19예의 신생검 조직을 대상으로 하였다. 5예에서는 사이클로스포린 치료 후 15개월에서 45개월(평균 26.1개월) 경과 후 추적생검을 한 차례 더 시행하였다.

### 2. 병리조직학적 검색

생검된 신장 조직은 10% 포르말린에 고정된 후 hematoxylin-eosin염색과 periodic acid-Schiff (PAS) 염색, 그리고 acid fuchsin orange G (AFOG) 염색을 시행하였다. 광학현미경 검색으로 신장의 피질 부위가 충분히 포함되어 있는 것과 최초의 생검이 조직학적으로 정상 소견을 보이는 것을 확인하고, AFOG 염색을 이용하여 간질 섬유화 여부를 판정하였다. 치료후에 섬유화가 발생한 그룹과 발생하지 않은 그룹으로 구분하였다.

### 3. 면역조직화학 염색

조직을 4  $\mu$ m의 연속 절편으로 박절하고 poly-L lysine으로 코팅된 슬라이드 위에 조직절편을 부착하여 탈파라핀과 재함수 과정을 거쳤다. 통상의 방법에 따라 적절하게

microwave와 수세, 과산화수소 처리 과정을 거친 후 일차 항체와 반응시켰다. Osteopontin (MPIIB10, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, IA, USA, 1:50)과 TGF- $\beta$  (Serotec, Washington DC, USA, 1:500)에 대하여 면역염색을 시행하였고, 근위 세뇨관 표지자로 알려져 있는<sup>19),20)</sup> *Lotus tetragonolobus*의 lectin (peroxidase-labelled, Sigma, St. Louis, USA, 1:50)과 원위 세뇨관의 표지자인 *Arachis hypogaea*의 lectin (peroxidase-labelled, Sigma, St. Louis, MO, USA, 1:50) 및 Tamm-Horsfall 단백 (Calbiochem, Germany, 1:50)에 대한 면역조직화학염색을 추가로 시행하여 osteopontin의 발현 부위를 확인하였다.

#### 4. 면역조직화학 염색 관독

각각의 조직을 200배의 배율에서 10 시야씩 검경 하였으며 이 때 모든 염색에서 동일한 부위가 검경 되도록 주의하였다. 관찰한 소견은 모두 디지털 카메라로 전산 처리하여 저장하였다.

##### 1) 사구체의 osteopontin 발현

사구체의 osteopontin의 발현 정도는 양성 반응을 보이는 사구체 메산지움의 면적을 점수화 하여 반정량적으로 구하였다. 사구체 메산지움 면적의 25% 이하가 갈색으로 염색된 경우를 1점, 25% 이상 - 50%미만이 염색된 경우를 2점, 그리고 50% 이상 염색된 경우를 3점으로 처리하였다. 200배 10시야에서 포함된 모든 사구체에서의 점수의 총합을 사구체 수로 나눈 결과(Score/Glomerulus)를 그 생검 조직에서의 사구체 osteopontin 발현을 나타내는 지표로 사용하였다.

##### 2) 세뇨관의 osteopontin 발현

세포질이 갈색으로 염색된 상피세포가 둘레의 50% 이상을 차지하는 세뇨관을 양성으

로 판정하였다. 결과는 200배 10개의 시야에 절단면이 포함된 전체 세뇨관의 수 중 양성인 세뇨관이 차지하는 백분율(% positive tubule)로 나타냈으며 원위 세뇨관, 근위 세뇨관, 그리고 이들의 합인 전체 세뇨관에서의 값을 구별하여 구하였다. 원위 세뇨관과 근위 세뇨관은 PAS 염색에서 조직학적 소견으로 구분하였고, *Arachis hypogaea*와 *Lotus tetragonolobus* lectin, 그리고 Tamm-Horsfall 단백질의 염색 결과와 비교하여 분명히 확인하고자 하였다.

##### 3) 간질의 TGF- $\beta$ 발현

TGF- $\beta$ 의 발현 정도는 전체 간질의 면적 중 TGF- $\beta$ 에 갈색으로 염색되는 부분의 면적이 차지하는 정도를 백분율(% positive area)로 표시하였다. 면적을 계산하는 작업은 IMAGE PRO<sup>®</sup> PLUS (Version 4.0) 이미지 분석 프로그램을 사용하여 수행하였다.

#### 5. 통계학적 분석

통계 처리는 SPSS for Windows (Version 10.0) 통계 패키지를 사용하였다. 모집단이 적으므로 비모수적 방법을 택하였다. 사이클로스포린 치료 전과 후의 차이를 비교하기 위하여는 Wilcoxon signed rank test를 사용하였고, 광학현미경 소견으로 섬유화가 발생한 그룹과 발생하지 않은 그룹을 나누고 같은 그룹 내에서 섬유화 유무에 따른 차이를 비교하기 위하여는 Mann-Whitney test를 사용하였다. *P*-value는 0.05 이하일 때 의미 있는 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 임상정보 및 조직학적 소견

총 19명의 환아를 대상으로 하였으며 이중 15에는 남아, 나머지 4에는 여아이었다(Table 1).

처음 신장 생검 당시의 연령 분포는 2세에서 13세로 평균 연령은 6.9세였다. 사이클로스포린 투여 기간은 13예에서는 12개월 전후였고, 6예에서는 24개월 전후로, 전체의 평균 치료 기간은 15.9개월이었다.

**Table 1.** Clinical features and their pathologic findings of the 19 patients.

Case No.	Sex	Age (yrs)	Duration of CsA treatment (months)	Development of interstitial fibrosis after CsA treatment
1	M	5.0	24.1	Y
2	M	8.2	12.0	N
3	M	11.8	11.8	Y
4	M	4.6	13.6	N
5	M	4.5	12.0	N
6	M	7.2	12.0	Y
7	M	2.2	12.0	N
8	F	4.5	24.1	N
9	M	11.7	24.0	Y
10	M	2.3	18.4	Y
11	M	9.8	23.9	N
12	M	2.3	11.9	Y
13	F	12.1	12.0	Y
14	M	7.5	12.0	Y
15	F	3.0	11.1	Y
16	M	5.3	24.5	Y
17	M	11.8	18.6	Y
18	M	3.4	12.1	Y
19	F	13.0	11.7	Y
Mean		6.9±3.8	15.9±5.5	

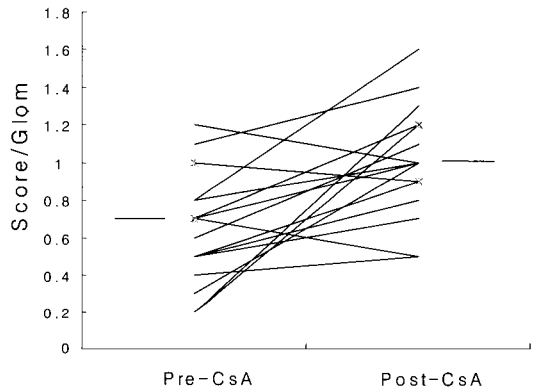
PAS 염색과 AFOG 염색을 검경하여 사이클로스포린 치료 전과 후의 조직학적 변화를 관찰하였다. 추적 생검에서 6예에서 간질의 섬유화가 새로 발생하였으며, 간질 섬유화 발

생과 치료 기간 간에는 상관관계가 없었다 ( $P=0.432$ ). 혈관의 초자양 변화는 모든 예에서 관찰되지 않았다.

## 2. 면역조직화학 염색 소견

### 1) 사구체의 osteopontin 발현

사구체에서 osteopontin의 발현은 사이클로스포린 치료 전에는 평균  $0.7 \pm 0.3$ 이었고 치료 후  $1.0 \pm 0.3$ 이었으며, 각 증례에서 치료 전과 치료 후를 짝지워 변화를 비교하였을 때 그 값이 유의 있게 증가한 것으로 나타났다 ( $P=0.001$ ). (Fig. 1)



**Fig. 1.** Osteopontin expression in glomerular mesangium. Pre-CsA vs. Post-CsA :  $P=0.001$  (Bar means median)

치료 후 간질 섬유화 발생 유무에 따라 두 그룹으로 나누었을 때 (Fig. 2). 섬유화가 발생한 그룹에서는 치료 후 osteopontin 발현이 치료 전에 비하여 유의 있게 증가했으나 ( $P=0.006$ ), 섬유화가 발생하지 않은 그룹에서는 치료 전후 유의 있는 차이가 없었다 ( $P=0.088$ ). 또, 치료 전 사구체 내 osteopontin의 발현은 치료 후 간질의 섬유화가 발생한 그룹과 그렇지 않은 그룹에서 차이가 없었으며 ( $P=0.650$ ), 치료 후에도 역시 차이가 없었다 ( $P=0.340$ ).

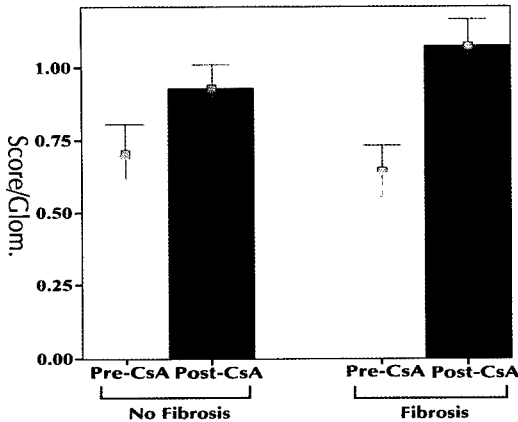


Fig. 2. Osteopontin expression in glomerular mesangium. (mean ± SEM) Fibrosis group :  $P=0.006$  No fibrosis group :  $P=0.088$

2) 세뇨관의 osteopontin 발현 (Fig. 3-a, 3-b)

사이클로스포린 치료 전 근위 세뇨관은 평균  $10.7 \pm 7.5\%$ 에서, 원위 세뇨관은 평균  $32.3 \pm 21.4\%$ 에서 osteopontin을 발현하였다. 사이클로스포린 치료 후 근위 세뇨관은  $14.3 \pm 9.3\%$ , 원위 세뇨관은  $43.5 \pm 18.6\%$ 로 각기 사이클로스포린 치료 전보다 osteopontin의 발현율이 증가하였지만 통계적인 의의는 없었다(근위 세뇨관 :  $P=0.243$ , 원위 세뇨관 :  $P=0.099$ ). 전체 세뇨관에서의 osteopontin 발현을 비교하였을 때 사이클로스포린 치료 전보다 치료 후 osteopontin 발현 빈도가 의의 있게 증가하였다(치료 전 :  $18.6 \pm 8.2\%$ , 치료 후 :  $24.8 \pm 7.7\%$ ,  $P=0.040$ ). (Fig. 4) 치료 후 간질 섬유화 발생에 따라 그룹을 나누었을 때 (Fig. 5) 전체 세뇨관의 osteopontin 발현은 섬유화가 있는 그룹( $P=0.136$ )과 없는 그룹( $P=0.128$ )에서 모두 의미 있는 차이가 없었다. 또, 치료 전 전체 세뇨관에서의 osteopontin 발현 정도는 섬유화가 있는 그룹과 없는 그룹간에 차이가 없었으며( $P=0.261$ ), 치료 후의 결과도 역시 그룹 간에 의미 있는

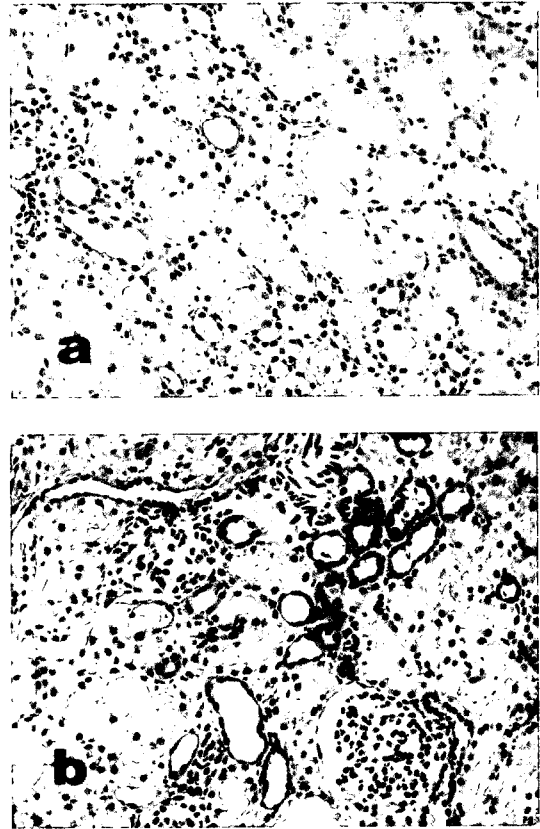


Fig. 3. Immunohistochemical staining of osteopontin, TGF- $\beta$ , and tubular markers. a, b : Osteopontin expression of pre-treatment (a) and post-treatment (b). Expression is increased mainly in the distal tubules.

차이가 없었다 ( $P=0.340$ ).

3) 간질의 TGF- $\beta$  발현 (Fig. 6-c, 6-d)

간질에서 TGF- $\beta$ 에 양성으로 염색되는 면적은 사이클로스포린 치료 전  $8.6 \pm 5.7\%$ 에서 치료 후  $9.4 \pm 4.5\%$ 로 그 평균 값은 증가하였지만 통계적인 의의는 없었다( $P=0.334$ ) (Fig. 7)

치료 후 간질 섬유화 발생 유무에 따라 그룹을 나누어 분석하였을 때 (Fig. 8) 섬유화가 있는 그룹과 없는 그룹 간에 치료 전

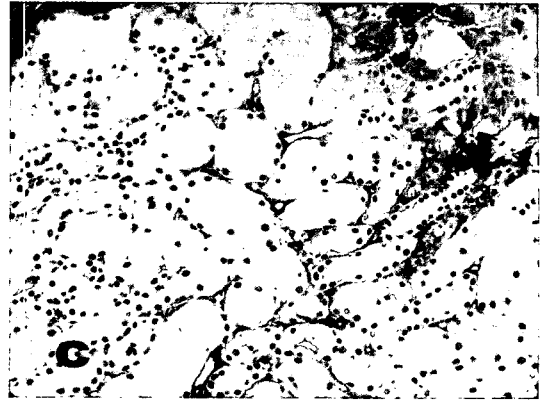
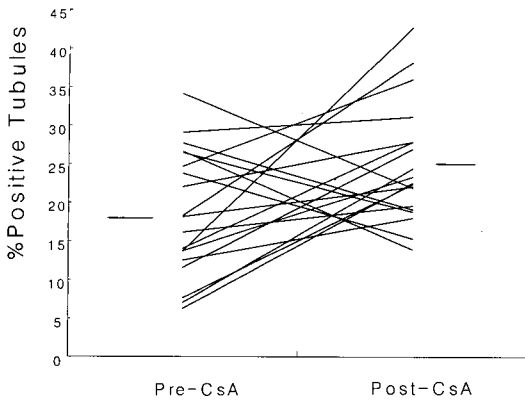


Fig. 4. Osteopontin expression in tubules. Pre-CsA vs Post-CsA :  $P=0.040$  (Bar means median)

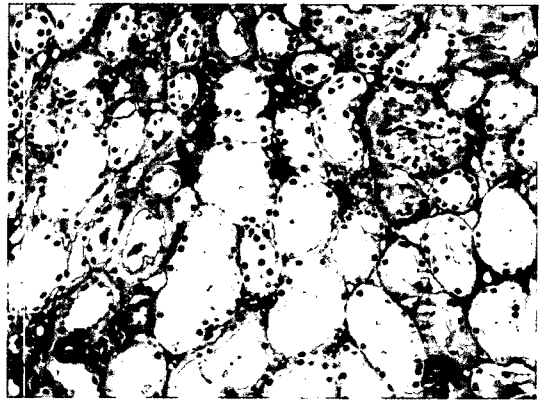
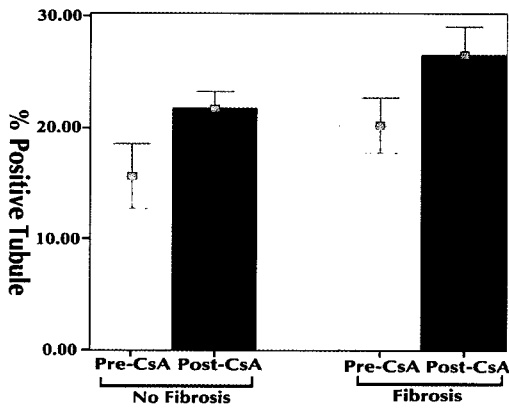


Fig. 6. Interstitial TGF- $\beta$  expression of pre-treatment (c) and post-treatment (d).

Fig. 5. Osteopontin expression in tubules. (mean  $\pm$  SEM) Fibrosis group :  $P=0.136$   
No fibrosis group :  $P=0.128$

TGF- $\beta$  값에 차이가 없었으며( $P=0.167$ ), 치료 후에도 역시 차이가 없었다. ( $P=0.482$ ). 또, 섬유화가 있는 그룹에서 치료 전 후 TGF- $\beta$  값은 차이가 없었으며( $P=0.638$ ), 섬유화가 없는 그룹의 치료 전 후 TGF- $\beta$  값도 의미 있는 차이가 없었다( $P=0.310$ ).

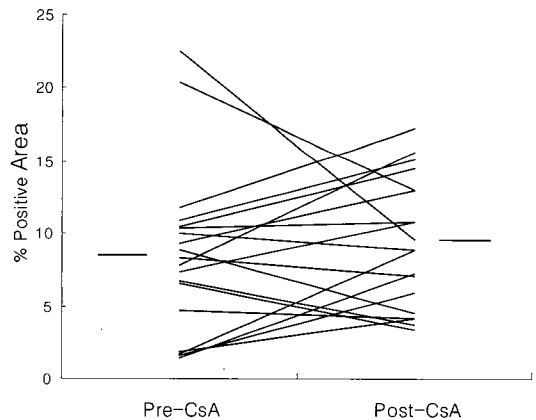


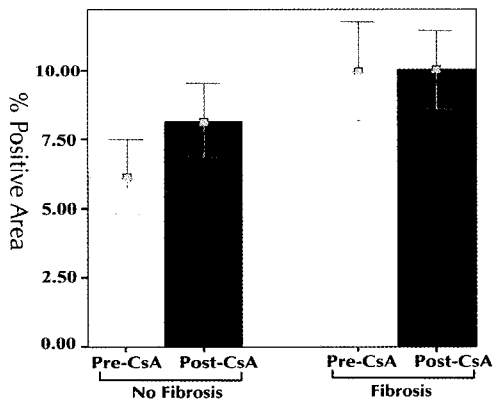
Fig. 7. TGF- $\beta$  expression in interstitium. Pre-CsA vs. Post-CsA :  $P=0.334$  (Bar means median)

**Table 2.** Changes in the expression of osteopontin and TGF-β in follow-up biopsies after cyclosporine treatment.

Case No.	Glomerular osteopontin*			Tubular osteopontin**			Interstitial TGF-β***		
	Pre-CsA <sup>1</sup>	Post-CsA <sup>2</sup>	Off-CsA <sup>3</sup>	Pre-CsA	Post-CsA	Off-CsA	Pre-CsA	Post-CsA	Off-CsA
1	0.2	1.2	1.5	13.8	42.6	19.3	1.9	4.2	3.2
2	0.7	0.5	1.1	23.8	15.3	22.9	1.4	7.3	6.3
3	0.7	1.2	1.3	16.1	19.5	13.7	6.7	3.7	10.4
4	0.7	1.2	1.1	26.4	18.8	33.0	4.7	4.2	1.4
5	1.1	1.4	1.1	34.1	21.8	26.5	1.6	5.9	7.2
Mean	0.7	1.1	1.2	22.8	23.6	23.1	3.3	5.1	5.7

- 1 Biopsy at intitial diagnosis (before CsA treatment)
- 2 Biopsy within 1.5 months (mean) after completion of CsA treatment
- 3 Biopsy after 26.1 months (mean) after completion of CsA treatment<sup>1</sup>

\* score/glom. \*\* % positive tubule \*\*\* % positive area



**Fig. 8.** TGF-β expression in interstitium. (mean ± SEM) Fibrosis group :  $P=0.638$   
No fibrosis group :  $P=0.310$

4) 사이클로스포린 치료 중지 후 추적생검을 시행한 예에서의 osteopontin 및 TGF-β 발현 변화 (Table 2)

사이클로스포린 치료 후 추적 생검을 한 차례 더 시행한 5예 대하여 사구체 osteopontin, 세노관 osteopontin, 그리고 간질 TGF-β에 대하여 통계학적 분석을 시행한 결과 사이클로스포린 투여를 중지한 후에도 각 측정치의 평균값은 증가하는 경향이 있었으나 통계학적인 의미는 없었다.

## 고찰

동물 실험에서는 수 차례 확인된 바임에도 불구하고 이제까지 사람에서 osteopontin과 사이클로스포린 신독성의 관계는 명확한 결론을 내린 연구 결과가 발표되지 않았다. 이는 동물과 달리 사람에서는 인위적으로 사이클로스포린을 투여하는 실험을 할 수 없기 때문에 기존 질환의 치료를 위하여 사용하는 경우를 연구의 대상으로 삼아야 하는데, 이 경우 기존 질환에 의해 처음부터 가지고 있던 이상 소견들과 사이클로스포린에 의해 새로 발생한 변화를 구별할 수 없다는 점과, 이 문제를 해결하기 위한 적절한 대조군을 설정하기 어렵다는 점 때문이다.

사이클로스포린에 의한 변화를 보기 위하여 한 사람에서 순차적으로 생검한 조직을 비교하는 방법은 Habib 등<sup>3)</sup>과 Zachariae 등<sup>21)</sup>에 의하여 소개된 바 있다. 본 연구는 치료 목적으로 사이클로스포린을 사용한 경우 중기저 질환이 미세변화 신증후군으로 광학현미경상 정상 소견인 증례만을 골라 이들을 대조군으로 사용함으로써, 기저 질환에 의한



영향을 배제한 체 사이클로스포린에 의한 변화를 구별해보고자 하였다.

여러 저자들에게 의하여 소아 신증후군에서 나타나는 사이클로스포린 신독성의 조직학적 양상은 이식신에서와 다름이 보고되어 왔다. 즉 이식신에서는 간질의 섬유화와 함께 소혈관의 초자양 변화가 매우 특이적인 소견임에 비해 소아에서는 세뇨관 및 간질의 변화가 더 특징적으로 나타나는 소견이다<sup>3)</sup>. 이러한 세뇨관-간질의 변화 정도는 사이클로스포린 치료의 기간, 용량, 혈중 농도와 관계 없다고 알려져 있으며<sup>3)</sup>, 간질 섬유화 여부와 조직에서의 renin 활성화도 역시 관계 없다는 보고가 있다<sup>22)</sup>. 또, Hamahira 등<sup>23)</sup>의 연구에서 소아의 사이클로스포린 신독성시 혈관의 변화는 가역적이거나 세뇨관-간질의 변화는 사이클로스포린을 중단한 후에도 계속 진행되었던 것으로 보아 소아에서는 혈관의 변화보다 세뇨관-간질의 변화에 주의하여야 함을 알 수 있다. 본 연구에 포함된 증례들에서도 간질 섬유화 외에 뚜렷한 혈관의 변화는 전 예에서 관찰되지 않은 점이 위의 보고들과 일치하고 있으며 따라서 본 연구를 진행함에 있어서 세뇨관-간질의 변화에 초점을 맞추는 것으로 사이클로스포린에 의한 변화를 충분히 검증할 수 있을 것으로 생각하였다. 이러한 이유로 본 연구의 범위를 osteopontin과 TGF- $\beta$ 로 대표되는 세뇨관-간질의 변화로 한정하였다.

Osteopontin의 발현은 사구체와 세뇨관을 나누어서 각각 측정하였다. 사이클로스포린 치료 전후에 사구체 메산지움의 osteopontin 발현이 증가하였다. 근위 세뇨관과 원위 세뇨관의 발현을 비교하였을 때, 사이클로스포린 치료 전과 후 모두 원위 세뇨관에서의 osteopontin 발현이 근위 세뇨관의 발현보다 유의하게 높았으며 (치료 전 :  $P=0.001$ , 치료 후 :  $P<0.001$ ) 이는 Okada 등<sup>17)</sup>, Hudkins 등<sup>18)</sup>이 관찰한 바와 일치하였다. 사이클로스

포린 치료 전과 후를 비교하였을 때 근위 세뇨관과 원위 세뇨관, 그리고 전체 세뇨관에서 모두 osteopontin 발현의 평균값이 증가하였으며 이중 통계학적으로 유의 있는 것은 전체 세뇨관에서의 값이었다. 그러나 osteopontin의 증가에도 불구하고 TGF- $\beta$ 의 값은 의미가 없어서 사이클로스포린에 의한 사구체 및 세뇨관내 osteopontin의 증가와 TGF- $\beta$  발현으로 대표되는 간질 섬유화와 연관이 있다는 증거를 제시할 수 없었다.

이를 다시 확인하기 위하여 연구에 포함된 증례들을 광학현미경으로 관찰하여 치료 후에 간질 섬유화가 발생한 그룹과 그렇지 않은 그룹으로 나누어 분석하였다. 섬유화는 대부분 그 정도가 경미하였다. 섬유화가 발생한 그룹에서는 사구체 메산지움내 osteopontin 발현이 치료 후 뚜렷이 증가하였으나 섬유화가 발생하지 않은 그룹에서는 변화가 없었다. 그 외 세뇨관의 osteopontin과 간질의 TGF- $\beta$  발현은 섬유화 유무에 따라 그룹을 나누었을 때는 치료 전후 뚜렷한 변화를 보이지 않는 것으로 나타났다. 즉, 섬유화가 뚜렷하게 진행된 증례들에서도 세뇨관의 osteopontin 발현과 간질의 TGF- $\beta$  발현에는 분명한 연관성이 없었다. 마지막으로 치료 전 osteopontin과 TGF- $\beta$ 의 발현 정도가 치료 후에 섬유화가 발생한 그룹과 그렇지 않은 그룹 간에 차이가 있는지를 분석하였으나 이 또한 의미 있는 결과를 보이지 않아 사이클로스포린에 의한 섬유화가 치료 전 osteopontin이나 TGF- $\beta$ 의 발현 정도에 영향을 받는 것은 아니라고 생각하였다. 그러나 섬유화가 발생한 12 증례와 발생하지 않은 7 증례의 두 그룹으로 나눌 경우 각각의 그룹이 통계처리를 하기에는 그 수가 부족하기 때문에 이 결과의 통계적 의미를 그대로 받아들일 수는 없을 듯 하다. 또한 섬유화가 발생한 예들도 그 정도가 경미하므로 TGF- $\beta$  발현의 차이가 뚜

렸하지 않았을 가능성이 있다. 따라서 대상 환자 수가 더 많아지거나 섬유화가 현저한 예가 포함되면 다른 결과가 나올 가능성도 있을 것으로 생각된다.

사이클로스포린을 중단한 뒤에도 섬유화는 지속된다는 보고들이 있어서, 본 연구에서도 사이클로스포린 중단 후 26개월이 경과한 후 두 번째 추적 생검을 시행한 5예의 결과를 분석하여 사이클로스포린에 의해 일어난 각각의 변화가 치료를 중단한 후에도 지속되는지의 여부를 알아보고자 하였다. 간질의 TGF- $\beta$ 의 평균치는 치료 전과 비교할 때 치료 직후와 시간이 흐른 후에 지속적으로 증가한 채 유지되었지만 통계적으로 의미 있는 변화는 얻지 못하였으며 이 역시 증례 수가 적음으로 인하여 의미를 부여하기 어려울 듯 하다.

결국 본 연구에서 얻은 결과는 사이클로스포린 치료에 의해 사구체 간질과 세뇨관에서의 osteopontin의 발현이 증가하지만 이것이 간질의 TGF- $\beta$  발현의 증가와 관련이 있지는 않다는 것이며, 이것은 사람의 사이클로스포린 신독성에서 osteopontin 발현이 동물 실험에서 알려진 것처럼 대식세포의 유입, TGF- $\beta$  증가, 그리고 간질 섬유화로 이어지는 일련의 과정과 관련성이 적다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 대식세포 유입 여부는 검증하지 않았기 때문에 앞으로 이에 대한 추가 연구가 필요하리라고 생각한다.

최근 Hudkins 등<sup>18)</sup>은 사이클로스포린 신독성이 증명된 환자들에게서 얻은 23예의 신생검 조직과, 신이식을 위하여 절제된 공여자의 신장에서 얻은 7예의 신생검 조직에서 근위세뇨관에서의 osteopontin의 발현 증가를 보고하였으나, 이는 대식세포 침윤 정도와는 상관관계가 없었다. 공여자 신조직에서의 증가는 수술 과정에서의 저온, 저산소 상태로 인한 조직 손상과 관련될 가능성이 있으므로

osteopontin의 발현은 세뇨관 손상으로 인한 비특이적 현상이라는 결론을 내렸다.

본 연구의 결과는 Hudkins 등의 가설을 뒷받침한다고 생각된다. 즉, 사이클로스포린 투여시 사구체 간질과 세뇨관의 osteopontin의 발현 증가는 사구체 및 세뇨관 손상시 나타나는 비특이적 표지자로서의 의미가 있다고 보는 것이 더 타당할 듯 하다.

Iijima 등<sup>22)</sup>의 연구 결과 및 많은 동물실험 결과들은 renin-angiotensin 계의 활성화를 포함하는 허혈성 변화가 osteopontin 발현과 간질 섬유화에 중요한 역할을 하고 있음을 보여주며<sup>14,24,25)</sup> 사이클로스포린에 의한 혈관의 변화에 대해 기능적으로 접근한 연구들<sup>26),27)</sup> 역시 이같은 사실을 지지한다. 허혈에 의한 신손상은 큰 혈관 보다 세뇨관 주변 모세혈관 등 미세 혈관 손상이 더 중요할 가능성이 있으며, 특히 본 연구 결과 사구체내 osteopontin의 증가가 사구체내 허혈을 의미한다면 세뇨관 주변 모세혈관의 손상에 의한 허혈성 변화가 간질의 TGF- $\beta$  발현에 앞설 가능성이 있다. 앞으로 이에 대한 연구를 시행하여 미세 혈관의 변화 유무 및 관련성을 확인하는 것이 필요하리라 생각한다.

## 한 글 요약

**목적** : 사이클로스포린(cyclosporine)은 효과적인 면역 억제제로서 현재에는 장기 이식 후 뿐 아니라 다양한 자가면역성 질병에서 그 사용 범위를 넓히고 있다. 신독성은 사이클로스포린의 대표적인 부작용으로서 그 특징적인 조직학적 소견은 간질의 섬유화와 세동맥의 초자양 변화이다. 간질 섬유화에는 전통적으로 TGF- $\beta$ 가 관여하는 것으로 알려져 있으며 최근에 osteopontin이라는 단백질도 관여한다는 사실이 동물 실험을 통해 알려지고 있다. 사이클로스포린에 의한 간질 섬유화에

osteopontin이 관여한다는 사실이 여러 동물 실험을 통하여 알려져 있으나 사람에서는 아직까지 분명한 결론을 얻지 못하고 있다. 동일 환자에서 사이클로스포린 치료 전과 후에 두 번 생검을 시행한 신장 조직에서 osteopontin과 TGF- $\beta$ 의 발현을 조사하여 사이클로스포린과 이들의 관계를 밝히는 것이 본 연구의 목적이다.

**대상 및 방법** : 연세의대 세브란스 병원 소아과에서 신장 생검으로 미세변화 신증후군으로 진단 받은 19예를 대상으로 하여 사이클로스포린 치료 전 조직 검사 검체를 대조군으로 하고, 치료 후 조직 검사 검체를 비교군으로 하였다. 사구체 매산지움과 세뇨관에서의 osteopontin 발현과 간질에서의 TGF- $\beta$  발현을 면역조직화학염색으로 측정하였다.

**결과** : 사이클로스포린 치료 후 사구체 매산지움과 세뇨관에서 osteopontin의 발현이 의의 있게 증가하였지만 간질에서 TGF- $\beta$ 의 증가는 뚜렷하지 않았다. 또한 세뇨관의 osteopontin과 간질의 TGF- $\beta$ 의 변화는 광학현미경으로 관찰되는 간질 섬유화와는 상관관계가 없었다. 따라서 사이클로스포린 사용시 osteopontin의 발현의 증가와 간질 섬유화 간에는 직접적인 연관이 없는 것으로 사료된다.

**결론** : 본 연구의 결과 실험 동물에서와는 달리 사람의 신장에서 osteopontin은 간질 섬유화에 직접 관여하기 보다는 신장 손상에 대한 표지자로서의 의미가 있다고 추정된다.

### 참 고 문 헌

1. Klein M, Radhakrishnan J, Appel G. Cyclosporine treatment of glomerular diseases. *Annu Rev Med* 1999;50:1-15.
2. Ader JL, Rostaing L. Cyclosporin nephrotoxicity: pathophysiology and compa-

3. Habib R, Niaudet P. Comparison between pre- and posttreatment renal biopsies in children receiving ciclosporine for idiopathic nephrosis. *Clin Nephrol* 1994;42:141-6.
4. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991;39:550-6.
5. Vieira JM, Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF- $\beta$  expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 1999;68:1746-53.
6. Islam M, Burke JF, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, et al. Effect of anti-transforming growth factor- $\beta$  antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int* 2001;59:498-506.
7. Brown LF, Berse B, Van de Vater L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surface. *Mol Biol Cell* 1992;3:1169-80.
8. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 1989;23:123-36.
9. Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Butler WT. 44-kDa bone phosphoprotein(osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell Tissue Res* 1988;251:23-30.
10. Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y, Couser WG, Johnson RJ, Alpers CE. Osteopontin expression in fetal and mature human

- kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:444-57.
11. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001;60:1645-57.
  12. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, et al. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 1999; 56:571-80.
  13. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, et al. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1995;48:439-48.
  14. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:1186-96.
  15. Pichler R, Giachelli CM, Lombardi D, Pippin J, Gordon K, Alpers CE, et al. Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis. Potential role of osteopontin (uropontin). *Am J Pathol* 1994;144:915-26.
  16. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998;53:897-908.
  17. Okada H, Moriwaki K, Konishi K. Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *Am J Kidney Dis* 2000;36:498-506.
  18. Hudkins KL, Le QC, Segerer S, Johnson RJ, Davis CL, Giachelli CM, et al. Osteopontin expression in human cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 2001;60:635-40.
  19. Faraggiana T, Malchiodi F, Prado A, Churg J. Lectin-peroxidase conjugate reactivity in normal human kidney. *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 451-8.
  20. Nadasdy T, Laszik Z, Blick K, Johnson DL, Silva FG. Tubular atrophy in the end-stage kidney: a lectin and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1994;25: 22-8.
  21. Zachariae H, Kragballe K, Hansen HE, Marcussen N, Olsen S. Renal biopsy findings in long-term cyclosporin treatment of psoriasis. *Br J Dermatol* 1997; 136:531-5.
  22. Iijima K, Hamahira K, Kobayashi A, Nakamura H, Yoshikawa N. Immunohistochemical analysis of renin activity in chronic cyclosporine nephropathy in childhood nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:2265-71.
  23. Hamahira K, Iijima K, Tanaka R, Nakamura H, Yoshikawa N. Recovery from cyclosporine-associated arteriopathy in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2001;16:723-7.
  24. Persy VP, Verstrepen WA, Ysebaert DK, De Greef KE, DE Bore ME. Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 1999;56: 601-11.
  25. Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM, et al. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 1994;45:515-24.

26. Roulet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanism of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1994;93:2244-50.
27. Myers BD, Newton L. Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:S45-52.