

## Glycerol-유도 급성신부전에서 포피성장인자 발현 및 조직학적 변화에 관한 스쿠알렌의 효과

최영복, 김영호, 이준행<sup>1</sup>, 김종세  
조선대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>남부대학교 방사선과

### Effects of Squalene on The Epidermal Growth Factor (EGF) Expression and Histological Changes by Glycerol-Induced Acute Renal Failure in Mice

Young-Bok Choi, Young-Ho Kim, Jun-Heung Lee<sup>1</sup> and Jong-Se Kim  
Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University,  
<sup>1</sup>Dept. of Radiology, Nambu University, Gwangju, Korea  
(Received October 13, 2004; Accepted November 18, 2004)

#### ABSTRACT

Kidney had recovery functions against toxicants, ischemia, reperfusion induced damage, acute renal failure (ARF). Urinary epidermal growth factor(EGF) is produced by the juxtaglomerular apparatus. Kidney accumulates or excretes the EGF. In case of renal diseases, excreted EGF was decreased. The aim of this study is to evaluate the effects squalene (SQ) on the prevention of experimental acute renal failure induced by glycerol.

In case of *in vitro* study, we investigated the expression of EGF by RT-PCR. After the proximal tubular cells was isolated, glycerol (1, 2, 4 mM) or glycerol plus squalene (0.1, 0.05 or 0.1%) was added. In case of *in vivo* study, we investigated the changes of BUN, creatine, and ultrastructure. Experimental groups were divided into four groups. Group 1 was normal mouse. Group 2 was injected with SQ only (180 mg/kg). Group 3 was not treated with squalene after intraperitoneal contamination of glycerol (50%, 8 ml/kg). And, Group 4 was treated with squalene (180 mg/kg) after intraperitoneal contamination of glycerol (50%, 8 ml/kg). All groups were used to 7 mice.

In the results, we investigated the glycerol induced renal failure. The expression of EGF mRNA was decreased in renal proximal tubules when treated with only glycerol. SQ increased the mRNA expression of EGF in renal proximal tubules. SQ also quickly recovered the levels of BUN and creatine compared with those of mice treated with only glycerol ( $P < 0.01$ ). In case of ultrastructure, group 3 had heavily damaged mitochondria, but, mitochondria in group 4 had evidences of the recovery.

It was concluded that SQ had the recovery effects for the glycerol induced acute renal failure.

**Key words** : Acute renal failure, Glycerol, Squalene

\*Correspondence should be addressed to Dr. Jong-Se Kim, Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju, 501-759, Korea. Ph.: (062) 230-6641, FAX: (062) 230-7984, E-mail: kyh5656@korea.com

## 서 론

신장은 독성물질, 빈혈, 재관류(reperfusion)-유도 상해에 대해 회복 기능을 가지고 있다. 하지만, 급성신부전(acute renal failure, 이하 ARF라 함)이 유도 되어지면 사구체여과 기능이 감소되고, 관을 통한 이온의 흡수 및 배설 기능이 억제된다(Hori et al., 1985). 또한, 능동수송 기능과 생체의 물질의 선택적 축적으로 인해 관 손상, 세포사 및 분리가 근위세뇨관(proximal tubular cell, 이하, PTC라 함)에서 빈번하게 관찰되어진다(Cuppage & Tate, 1967). PTC에서는 brush-border membrane microvilli의 내화현상, 세포 극성 상실 및 사립체 기능 장애,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 억제, 수송 기능 및 항상성 변경, ATP 고갈 등이 이루어진다(Helen et al., 1970; Toback, 1992).

표피성장인자(epidermal growth factor, 이하 EGF라 함)는 대략 분자량이 6 kDa 정도이며(Jesper et al., 1997), 53개 아미노산 잔기로 구성된 단일사슬 산성 폴리펩티드이다(Grant et al., 2002). EGF 생산에 관여하는 장기는 하악선과 십이지장 Brunner's 선인데, urinary EGF의 경우는 신장이며, 그 위치는 renal juxtaglomerular apparatus (신장사구체연접장치)이다(Peter et al., 1984). 이와 같이 분비된 EGF는 Henle's 고리 상행 부위와 근위세뇨관에 많이 분포를 한다(Jesper et al., 1997). 신장은 혈장으로부터 EGF를 축적할 수도 있고, 오줌을 통해 완전한 형태의 EGF를 배출할 수 있는데, 쥐의 경우에는 오줌을 통해 24시간 당 약 2 nmol 정도의 EGF가 배출된다(Per et al., 1990). 신장 질환의 경우 EGF 배출이 감소하는데, 특히, 고령과 당뇨병환자의 경우 배출이 감소되어진다(Arye et al., 1990). EGF는 glucose 운반(Grant et al., 2002), DNA 합성과 RNA 전사 조절에 관여하고(Carpenter & Cohen, 1979; Fumino et al., 1991), 신장관세포(renal tubular cell, 이하 RTC라 함)의 재생과 회복, post-ischemic ARF에서 신장 기능의 회복에 관여한다(Toback, 1992).

Squalene (hexamethyltetracosahexane,  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ , 이하 SQ라 함)은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구 물질로서, 특히, 심해 상어의 간, 올리브유 등에 많이 함유된 탄화수소로 피부, 복부지방조직, 피하지방조직,

립프질, 헤장 및 심근 등에 다량 함유되어있다(Liu et al., 1976). SQ는 6개의 이중결합이 있어 산소이온과 쉽게 결합할 수 있어서 유해 산소 제거능이 있으며(Kohno et al., 1995), 상처 치유, 혈관 확장, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 간질환 등(Budiarso, 1990)에 효과가 있으며, 화상 치료(Kim et al., 1999), 카르복실 독성 완화(Kim & Yoon, 2000), 항암효과(Yamawaki et al., 1978), 세포면역 반응 조절 및 항산화제 활성 효과가 있다고 보고하였다(Storm et al., 1993).

본 연구에서는 생쥐에 glycerol을 이용하여 ARF를 유도한 후, SQ 처치에 따른 EGF 발현 정도와 신장 조직 회복에 관해 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. SQ 농도별 EGF 발현 (*in vitro*)

#### 1) PTC 제조

PTC는 다음의 방법을 참조로 하여 준비하였다(Junro et al., 1995; Schaaf et al., 2001). 신장을 적출하여 Krebs-Ringer-Hepes (이하, KRH라 함) buffer를 관류시켜 혈액을 제거시켰다. 피질을 작은 조각으로 잘게 썰고 조직을 25~30 rpm에서 teflon-glass homogenizer (GlasCol, Terre Haute, IN, USA)와 nylon-gauze (pore size: 60  $\mu\text{m}$ )를 사용하여 균질화 하였다. 균질화한 후, 수확한 세포를 2~3회 정도 세척하였다.

#### 2) Glycerol과 SQ 처리

준비된 정상 PTC ( $2 \times 10^5$  cell)에 각각 Glycerol (1, 2, 4 mM)를 첨가하여 glycerol 농도별 EGF 발현을 관찰하였다. 정상 PTC와 SQ (0.01, 0.05, 0.1%)가 각각 첨가된 시료에 glycerol 농도 중 EGF 농도를 가장 많이 감소시킨 glycerol (4 mM)을 첨가하였다.

#### 3) 총 RNA 제조

총 RNA는 PTC에서 Trizol 시약을 사용하여 직접 분리하였다. 간단하게 설명하자면 다음과 같다. 각각의 시료에 1 mL Trizol 시약을 넣는다. Chloroform (200  $\mu\text{L}$ )을 첨가하고, 잘 섞은 다음 12,000 rpm에서 15분간 교반하였다. RNA가 함유되어 있는 상층액을 취하여 1.5 mL tube에 담고 동량의 isopropanol을 넣고  $-20^\circ\text{C}$

에서 20분간 반응시켰다. 그 후, 12,000 rpm에서 15분간 교반하고 75% ethanol을 이용하여 2~3회 세척하였다. RNA를 건조시키고, DEPC-DW 상에서 재현탁시킨 다음, 260 nm UV spectrophotometer (Technique, Cambridge, UK)에 총 RNA 농도를 측정하였다.

#### 4) 역전사중합효소연쇄반응

(Reverse transcription polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR)

EGF primers는 다음과 같다

forward primer:

5'-ATCTGACTTCATGGAGACAG-3'

reverse primer:

5'-AACTGGCTCTGTCTGCCGTG-3'

$\beta$ -actin을 표준으로 사용하였다. 총 RNA (1  $\mu$ g)와 Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer를 섞은 후 70°C에서 5분간 배양하였다. 배양 후 EGF primer를 Accu Power<sup>®</sup> RT/PCR PreMix tube (Bioneer, Daejeon, Korea)에 옮기고, 반응 용량을 DEPC-DW를 이용하여 20  $\mu$ L로 보정하였다. 역전사반응은 60분간 42°C, RTase 비활성화 반응은 94°C 5분간 수행하였고, 4°C에서 보관하였다. PCR 조건은 다음과 같이 수행하였다. 초기 변성은 3분간 94°C에서 수행한 후, 30초 94°C에서 변성, primer annealing 반응 30초 55°C, primer extension 반응 30초 72°C의 조건으로 30회 반복하였고, 최종 신장 단계에서는 5분간 72°C에서 수행하였다. 사용한 기계는 MyGenie32 PCR machine (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하였다. Band 밀도는 1D image analysis software (Eastman Kodak Co., New York, USA)을 사용하여 측정하였다.

## 2. glycerol 유도 신장 조직학적 변화 관찰

### 1) 실험 동물

본 실험에 사용한 실험동물로는 샘타코에서 생산, 공급하고 있는 ICR계 생쥐 (체중 25~35 g)를 사용하였다. 생쥐는 23  $\pm$  2°C, 습도는 45  $\pm$  5%로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장 (40  $\times$  25  $\times$  17 cm)에서 사육하였으며, 사료(계일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취 시켰다. SQ는 (주)세로 제품을 사용하

였다.

### 2) 혈청학적 분석

혈액은 1 cc 주사기를 사용하여 heart-puncture 방식으로 채취하였다. Blood urea nitrogen (이하, BUN이라 함), creatine 등을 임상화학 분석기 (Vet-Scan, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

### 3) 신장의 전자현미경적 관찰

실험군은 다음과 같다. 실험군 1은 정상군, 실험군 2와 3은 SQ (180 mg/kg)만 혹은 glycerol (50%, 8 ml/kg)만 단독으로 복강 주사한 군, 실험군 4는 glycerol (50%, 8 ml/kg)를 복강 처치한 후, SQ (180 mg/kg)를 복강 처치한 군으로 각 군별 24, 48, 72, 96시간별로 관찰하였으며, 각 실험군 당 생쥐 7마리를 사용하였다.

### 4) 전자현미경적 관찰

신장조직은 신속하게 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)에서 2시간 전고정 하였다. 전고정후, 동일 완충액을 사용하여 3회 수세하였다. 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)로 2시간 후 고정된 후, 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 저농도의 ethanol (50%)로부터 ethanol 계열 하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, epon mixture 완충액에서 over night 후 포매하였다. 그리고, 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합 하였다. epon block을 1  $\mu$ m로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 proximal tubule 부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (Hitachi, H-7,600, Japan)으로 가속전압 80 kV하에서 관찰하였다.

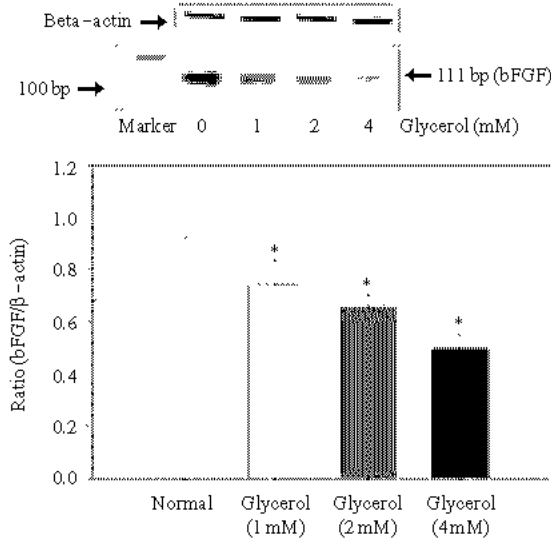
### 5) 통계학적 분석

각 실험군 별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 프로그램인 SAS를 이용하여 Anova test에 의하여 검정하였으며, 각 P값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

**Table 1.** Effects of glycerol and SQ on the mRNA expression of EGF in proximal tubular cell

Groups	mean±SD
Normal	0.924±0.035
Glycerol (1 mM)	0.739±0.092
Glycerol (2 mM)	0.655±0.046*
Glycerol (4 mM)	0.494±0.048*
Glycerol (4 mM)+SQ (0.01%)	0.470±0.090
Glycerol (4 mM)+SQ (0.05%)	0.671±0.097+
Glycerol (4 mM)+SQ (0.1%)	0.900±0.101+

\*P<0.05 as compared with normal, +P<0.05 as compared with glycerol (4 mM)

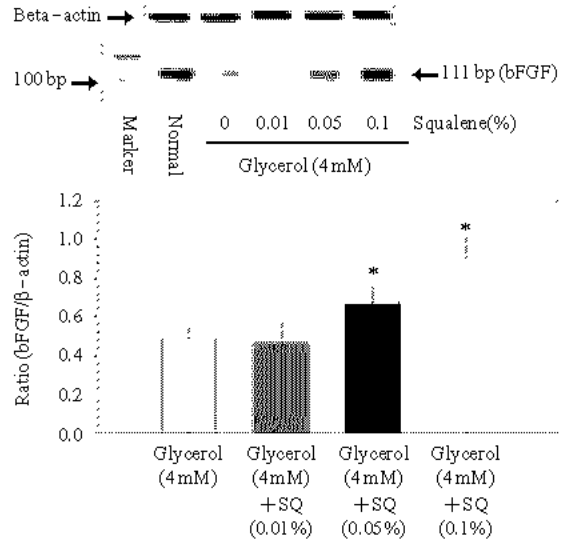


**Fig. 1.** Effect of glycerol on the mRNA expression of EGF in the proximal tubular cell. \*p<0.05 as compared with normal

**Table 2.** Changes of BUN after the glycerol-induced acute renal failure

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
24 h (mg/dL)	27.9±2.1	29.0±3.8	43.6±3.3	39.7±2.7
48 h (mg/dL)	28.6±2.5	29.3±2.2	40.2±3.7	32.3±1.9*
72 h (mg/dL)	28.0±1.0	29.7±1.5	37.7±2.8	31.3±1.0*
96 h (mg/dL)	28.3±2.1	28.8±1.3	32.2±1.9	30.0±1.2

\*P<0.01 as compared with Group 3, Group 1. Normal mice. Group 2. Squalene (180 mg/kg) was injected only. Group 3. No treatment with squalene after the glycerol (50%, 8 ml/kg) -induced acute renal failure. Group 4. Squalene (180 mg/kg) was injected after the glycerol-induced acute renal failure.



**Fig. 2.** Effect of glycerol and SQ on the mRNA expression of EGF in the proximal tubular cell. \*p<0.05 as compared with glycerol (4 mM)

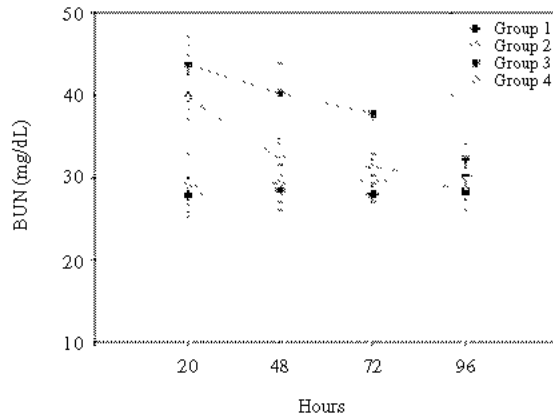
## 결 과

### 1. EGF mRNA 발현

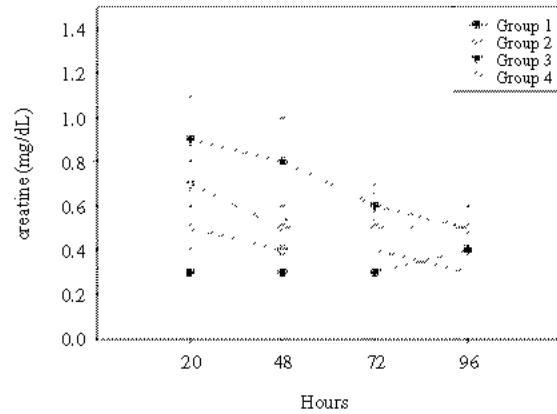
정상군에서 EGF mRNA 발현량은 0.924±0.035였다. glycerol 단독 처리군의 경우 EGF mRNA 발현량이 농도에 따라 감소하였다. Glycerol 1, 2, 4 mM에서 EGF mRNA 발현량은 0.739±0.092, 0.655±0.046, 0.494±0.048였다. Glycerol 농도 중 EGF 발현을 가장 많이 감소시킨 4 mM에 SQ를 농도별로 처리하면 EGF mRNA 발현량이 농도에 따라 증가함을 관찰하였다. Glycerol에 SQ 0.01, 0.05, 0.1%를 첨가한 후, EGF mRNA 발현량은 0.470±0.090, 0.671±0.097, 0.900±0.101였다(Table 1, Figs. 1-2).

### 2. BUN

Glycerol 단독 처리군에서 BUN 수치는 24시간부터 72시간까지 정상군 및 SQ를 함께 처리한 군보다 훨씬 높게 관찰되었다. 24, 48, 72, 96시간째에 43.6±3.3, 40.2±3.7, 37.7±2.8, 32.2±1.9이었다. Glycerol과 함



**Fig. 3.** Changes of BUN after the glycerol-induced acute renal failure. \* $P < 0.01$  as compared with Group 3. Group 1. Normal mice. Group 2. Squalene (180 mg/kg) was injected only. Group 3. No treatment with squalene after the glycerol (50%, 8 ml/kg)-induced acute renal failure. Group 4. Squalene was injected after the glycerol-induced acute renal failure.



**Fig. 4.** Changes of creatine after the glycerol-induced acute renal failure. \* $P < 0.01$  as compared with Group 3. Group 1. Normal mice. Group 2. Squalene (180 mg/kg) was injected only. Group 3. No treatment with squalene after the glycerol (50%, 8 ml/kg)-induced acute renal failure. Group 4. Squalene was injected after the glycerol-induced acute renal failure.

**Table 3.** Changes of creatine after the glycerol-induced acute renal failure

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
24h	0.3±0.0	0.5±0.1	0.9±0.2	0.7±0.1
48h	0.3±0.0	0.4±0.1	0.8±0.2	0.5±0.1*
72h	0.3±0.0	0.4±0.0	0.6±0.1	0.5±0.0
96h	0.4±0.0	0.3±0.0	0.5±0.0	0.5±0.1

\* $P < 0.01$  as compared with Group 3, Group 1. Normal mice. Group 2. Squalene (180 mg/kg) was injected only. Group 3. No treatment with squalene after the glycerol (50%, 8 ml/kg) -induced acute renal failure. Group 4. Squalene (180 mg/kg) was injected after the glycerol-induced acute renal failure.

깨 SQ를 처치한 군에서는 24시간째에는 glycerol 단독 처치군과 큰 차이를 보이지 않았으나, 48, 72시간째에 유의한 차이가 관찰되었다( $P < 0.01$ ). 24, 48, 72, 96시간째에  $39.7 \pm 2.7$ ,  $32.3 \pm 1.9$ ,  $31.3 \pm 1.0$ ,  $30.0 \pm 1.2$ 이었다(Table 2, Fig. 3).

### 3. Creatine

Glycerol 단독 처치군에서 creatine 수치는 24시간부터 72시간까지 정상군 및 SQ를 함께 처치한 군보다 훨씬 높게 관찰되었다. 24, 48, 72, 96시간째에  $0.9 \pm$

$0.2$ ,  $0.8 \pm 0.2$ ,  $0.6 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.0$ 이었다. Glycerol과 함께 SQ를 처치한 군에서는 24시간째에는 glycerol 단독 처치군과 큰 차이를 보이지 않았으나, 48시간째에 유의한 차이가 관찰되었다( $P < 0.01$ ). 24, 48, 72, 96시간째에  $0.7 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.0$ ,  $0.5 \pm 0.1$ 이었다(Table 3, Fig. 4).

### 4. 전자현미경적 관찰

전자현미경 관찰에서는 사립체의 변화를 살펴보았다. 사립체의 손상정도에 따라 가장 많이 손상된 것으로부터 최소한의 구조적 변화를 보이는 것을 그 정도에 따라 Ma, Mb 및 Mc의 3등급으로 구분하여 평가하였다.

24시간째 : 정상 세포에 비하여(Fig. 5) glycerol 단독 처치군의 경우 사립체의 손상이 Ma, Mb 상태가 대부분으로 사립체의 내막의 파괴 및 팽대가 전반적으로 관찰되었다(Fig. 6). Glycerol과 SQ를 함께 처치한 군에서는 대부분 Mb, Mc 상태로 관찰되었다(Fig. 7).

48시간째 : glycerol 단독 처치군의 경우 사립체의 손상이 Ma, Mb 상태가 대부분으로 사립체의 내막이 거의 파괴되었으며, 전반적으로 사립체 팽대가 관찰되

었다(Fig. 8). Glycerol과 SQ를 함께 처치한 군에서는 Ma, Mb의 상태를 보여 사립체 내막이 부분적으로 파괴되었으며, glycerol 단독 처치군에 비해 손상이 상당히 지연되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

72시간째 : glycerol 단독 처치군의 경우 사립체의 손상이 Mb 상태가 대부분으로 사립체의 회복이 진행됨을 관찰할 수 있었지만, 사립체 팽대는 계속적으로 관찰되었다(Fig. 10). Glycerol과 SQ를 함께 처치한 군에서는 대부분 Mb, Mc 상태로 굉장히 빠른 회복을 관찰할 수 있었으며, 약간의 사립체 팽대 현상만이 관찰되었다(Fig. 11).

96시간째 : glycerol 단독 처치군의 경우 부분적으로 사립체가 거의 회복된 Mc 상태를 보였고, Mb 상태의 사립체도 회복 단계에 있음이 확연히 관찰되었다(Fig. 12). 그러나, 대부분의 사립체는 여전히 팽대가 찰되었다. Glycerol과 SQ를 함께 처치한 군에서는 대부분 Mc 상태로 완전히 정상인 사립체로 회복되었고, 팽대 현상도 관찰되지 않았다(Fig. 13).

## 고 찰

Glycerol은 쥐를 대상으로 한 ARF 유도에 사용 되는데, ARF가 유도되면 신장 내 ATP 수치가 감소된다(Anna, 1981). Glycerol을 쥐에 주사하고 물을 공급하지 않으면 24시간 내에 ARF가 진행된다. 특히, 급성의 경우에는 6시간 이내에 ARF가 유도되며, 신장혈류흐름(renal blood flow, 이하, RBF라 함)이 감소하고, 사구체 nitric oxide 수치가 감소하는데, 지속적으로 물을 다량 주입하면 RBF가 정상적으로 회복되지만, 사구체 여과율은 회복되지 않는다. 그리고 hemoglobin과 myoglobin에서 철이 방출되어 혈액 내 heme기 농도가 증가하고, hemoglobin과 myoglobin이 hydroxyl 라디칼 형성을 촉진하는 Fenton reagent으로 작용함으로써 프리라디칼, 지질과산화물 등의 생선이 촉진된다(Reineck et al., 1980; Bertrand & Sudhir, 1989; Valdivielso et al., 2000). 또한, 막 투과성이 감소하고, P-glycoprotein 수치가 BUN, glutamic puruvic transminase 수치가 증가한다(Zhao et al., 2000). 쥐에 피하 주사를 통해 EGF (75 µg/kg)를 1주에서 4주간 투여하면 하악선의 무게

가 증가하지만, 하악선 내 EGF 농도는 1주째에는 변화가 없고, 4주째에는 3배 감소한다. 하지만, 신장의 경우 1주, 4주 모두 변화가 없고, 신장과 오줌 함유 EGF의 경우 4주째에 약 20~30% 정도 증가한다(Lars et al., 1998).

Vikas et al.(2003)은 쥐에 glycerol (50%, 8 mL/kg)을 근육 주사한 후, catechin (40 mg/kg)을 구강 주사하면 혈청 내 creatinine, SOD, BUN, glutathione, glutathione reductase 수치 회복 효과가 빠르게 관찰된다고 보고하였다. 본 실험에서는 BUN, creatinine의 수치를 관찰하였는데, SQ를 처치한 군에서 glycerol 단독 처치군에 비해 빠른 회복 효과를 관찰할 수 있었다. vitamin E의 경우 PTC 손상, 세포괴사 등을 회복시키는데, 투여 경로, 투여 방법, 투여 시간에 따라 효과가 각각 다르게 나타난다고 보고되어져 있다(Leslie et al., 1987; Ademuyiwa et al., 1990; Wang et al., 1995; Tekin et al., 2000). 본 실험에서는 glycerol를 복강 주사하고, glycerol 처치 후 30분 이내에 SQ를 처치하였는데 glycerol 단독 처치군에 비해 효과가 있음을 관찰할 수 있었다. 그리고, 항산화 작용 및 항암 효과가 있는 naringin을 농도별(100, 200, 400 mg/kg)로 처리하면, 농도가 높을수록 회복 효과가 빠르다(Devinder et al., 2004). 본 실험에서는 *in vitro*상에서 정상 PTC에 SQ를 단독 처리한 경우 EGF발현에 별다른 영향을 주지 않았으나, glycerol를 첨가하여 EGF 발현을 감소시킨 군에 SQ를 농도별로(0.01, 0.5, 0.1%) 처리한 경우에는 EGF 발현이 농도에 따라 회복됨을 관찰할 수 있었다.

glycerol 유도 ARF의 경우 조직학적 변화로는 신장 피질 탈락 및 세포괴사, 관 폐색, 손상된 관 상피세포를 통한 여과 상실, 세뇨관의 여과율 감소, 기저막 탈락, 세포간질성 부종, 세포간질성 염증 세포 침윤, 심한 기포 현상, 유리질 탈락, 관 세포괴사, 출혈 등이 발생한다(Anna et al., 1981; Stein et al., 1978; Telma et al., 2002; Vikas et al., 2003; Devinder et al., 2004). Grazyna et al.(1999)은 dichlorovinyl-L-cysteine-유도 ARF의 경우 EGF가 손상된 PTC의 사립체 기능 회복, 능동적 Na<sup>+</sup>-수송 기능의 회복, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP-ase 기능 활성화, 세포 증식을 자극한다고 보고하였다. 본 실험에서도 SQ를 처치한 군에서 glycerol만 단독 처치한 군에 비해 사립체의 회복이 빠르게 진행됨을 관찰할 수 있

었다.

본 연구를 통해서 SQ가 glycerol에 의해 유도된 신장 손상에 대해 회복 효과가 있는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2002년도 조선대학교 학술연구비 지원을 받아 수행하였음.

### 참 고 문 헌

- Ademuyiwa O, Ngaha EO, Ubah FO: Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 9 : 281-288, 1990.
- Anna LT, Myong WK, Benjamin FT: Metabolic studies of glycerol induced acute renal failure in the rat. *Experimental and Molecular Pathology* 35(1) : 1-13, 1981.
- Arye LR, David LH, John DM, Zeev J: Excretion of epidermal growth factor (EGF) in diabetes. *Clinica Chimica Acta* 192(3) : 201-206, 1990.
- Bertrand G, Sudhir VS: Enhanced in vivo  $H_2O_2$  generation by rat kidney in glycerol induced renal failure. *Am J Physiol* 257(26) : 440-445, 1989.
- Budiarso IT: Fish oil versus olive oil. *Lancet* 336 : 1313-1314, 1990.
- Carpenter, Cohen S: Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48 : 193-216, 1979.
- Cuppige FE, Tate A: Repair of the nephron following injury with mercuric chloride. *Am J Pathol* 51 : 405-429, 1967.
- Devinder S, Vikas C, Kanwaljit C: Protective effects of naringin, a bioflavonoid on glycerol induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology* 201 : 143-151, 2004.
- Fumino T, Nobuhiro S, Masaki H, Hirokazu M, Shoichi O, Masahiko F: Epidermal growth factor (EGF) decreased endothelin 2 (ET 2) production in human renal adenocarcinoma cell. *FEBS LETTERS* 295(1-3) : 17-21, 1991.
- Grant AM, James AH, Leonard RJ, Grant G: The role of PI 3 kinase in EGF stimulated jejunal glucose transport. *Can J Phys Pharm* 80 : 77-84, 2002.
- Grazyna N, Kenneth BK, Douglas EM, Rick GS: Differential effects of EGF on repair of cellular functions after dichlorovinyl L cysteine induced injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 276(45) : F228-F236, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol* 186 : 1-85, 1990.
- Helen BB, Oliver HL, Lucile M, Paul M, Kyung JC: Effects of fructose, dihydroxyacetone, glycerol, and glucose on metabolites and related compounds in liver and kidney. *J Bio Chem* 245(8) : 2092-2102, 1970.
- Hori R, Takano M, Okano T, Inui T: Transport of p-aminohippurate, tetraethylammonium, and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 233 : 776-781, 1985.
- Jesper T, Per Erik J, Ole T, Ebba N, Steen SP: Urinary excretion of epidermal growth factor and Tamm-Horsfall protein in three rat models with increased renal excretion of urine. *Regulatory Peptides* 72 : 179-186, 1997.
- Junro H, Ueda S, Naohiko A, Makoto O, Masao O, Yoko W, Masafumi W: Primary culture of proximal tubular cells (PTC) from normal mouse kidneys as an in vitro model to study mechanism of development of tubulointerstitial nephritis induction of ICAM-1 in PTC by antigen primed lymphocytes. *Jpn J Nephrol* 37: 157-164, 1995.
- Kim JS, Yoon JS, Choi YB, Choi KP, Kim JS, Chung SM: Healing effects of squalene on the epidermis in burned mouse. *Kor J Electron Microscopy* 29(2) : 163-175, 1999.
- Kim JS, Yoon JS: Effects of squalene on mouse liver toxicity with cadmium. *Kor J Electron Microscopy* 30(2) : 141-152, 2000.
- Kohno Y, Egawa Y, Itoh W, Nagoka S, Takahashi M, Mukai K: Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochem Biophys Acta* 1256(1) : 52-56, 1995.
- Lars VJ, Per Erik J, Jesper T, Steen SP, Ebba N: Time dependent changes of levels of endogenous epidermal growth factor in submandibular glands, in kidney, and in urine in rats during systemic treatment with EGF. *Regulatory Peptides* 78 : 75-82, 1998.
- Leslie SR, Christine J, Kit YL, Bernard PL, George JK: Failure of inhibition of lipid peroxidation by vitamin E to protect against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Biochemical Pharmacology* 36(13) : 2125-2132, 1987.
- Liu GCK, Ahrens Jr. EH, Sreibman PH, Crouse JR: Measurement of squalene in human tissues and plasma. *J Lipid*

Res 17(1) : 38-45, 1976.

Paller MS: Hemoglobin and myoglobin induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol* 255 : F539-544, 1988.

Per EJ, Torben NR, Peter SO, Lasse R, Steen SP, Ebba N: Renal uptake and excretion of epidermal growth factor form plasma in the rat. *Regulatory Peptide* 28(3) : 273-280, 1990.

Peter SO, Ebba N, Steen SP, Frede H, Preben K: Renal origin of rat urinary epidermal growth factor. *Regulatory Peptide* 10(1) : 37-45, 1984.

Reineck JH, O'Connor GJ, Lifschitz MD, Stein JH: Sequential studies on the pathophysiology of glycerol induced acute renal failure. *J Lab Clin Med* 96 : 357-362, 1980.

Schaaf, GJ Groene, EM Maas, RF Commandeur JNM and Fink Gremmels J: Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chemico Biological Interactions*. 134 : 167-190, 2001,

Stein JH, Lifschitz MD, Barnes LD: Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 234(3) : F171-F181, 1978.

Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S: Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipid* 28 : 555-559, 1993.

Tekin A, Ilkser A, Hamit O, Saban S, Arif MC, Bedri K: Effect of vitamin E and pentoxifylline on glycerol induced acute renal failure. *Nephron* 84 : 243-247, 2000.

Telma JS, Roberto SC, Rildo AV, Cleonice GA, Terezila MC: Longterm evolution of the acute tubular necrosis (ATN) induced by glycerol: role of myofibroblasts and macrophages. *Int J Exp Path* 83 : 165-172, 2002.

Toback FC: Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 41 : 226-246, 1992.

Valdivielso JM, Lorez JM, Eleno N, Barriocanal FP: Role of glomerular nitric oxide in glycerol induced acute renal failure. *Can J Physiol Pharmacol* 78 : 476-482, 2000.

Vikas C, Devinger S, Kanwaljit C: Catechin, a natural antioxidant protects against rhabdomyolysis induced myoglobinuric acute renal failure. *Pharmacological Res* 48 : 503-509, 2003.

Wang C, Salahudeen AK, Mcclain M: Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney Int* 47 : 927-934, 1995.

Yamawaki M, Azuma I, Saiki I, Uemiya M, Aoki O, Enryu K, Yamamura Y: Antitumor activity of squalene treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice. *Gann* 69 : 619-629, 1978.

Zhao HH, Teruo M, Atsuko O, Ryoko Y, Junya N, Mikihisu T: Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol induced acute renal failure. *European J Pharmacology* 406 : 453-460, 2000.

### < 국문초록 >

신장은 독성물질, 빈혈, 재판류 유도 상해, 급성신부전에 회복 기능을 가지고 있다. 노 코피성장인자(EGF)는 신장 사구체연접장치에서 생산된다. 신장은 EGF를 축적하거나 배설한다. 신장 질환의 경우에는 EGF 배설이 감소한다. 본 연구에서는 glycerol 유도 급성신부전에서 스쿠알렌의 효과를 연구하였다.

*In vitro*에서 RT-PCR를 통해 EGF 발현을 관찰하였다. 근위세뇨관 세포를 분리한 후, glycerol (1, 2, 4 mM) 혹은 스쿠알렌 (0.1, 0.05 or 0.1%)을 첨가하였다. *In vivo*에서 BUN, creatine, 조직학적 변화를 관찰하였다. 실험군은 다음과 같다. 실험군 1은 정상군, 실험군 2는 glycerol (50%, 8 ml/kg) 처치 후, 스쿠알렌을 처치하지 않은 군, 실험군 3은 glycerol (50%, 8 ml/kg) 처치 후, 스쿠알렌 (180 mg/kg)을 함께 처치한 군으로 각 실험군 당 생쥐 7마리를 사용하였다.

실험 결과, glycerol이 신장에 손상을 주어 EGF mRNA 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 스쿠알렌을 처치한 군에서는 EGF mRNA 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한, BUN과 creatine 수치의 빠른 회복이 관찰되었다 ( $P < 0.01$ ). 조직학적 관찰에서도 실험군 2는 사립체의 심한 손상이 관찰되었는데, 실험군 3의 경우 사립체의 빠른 회복이 관찰되었다.

결론적으로, 스쿠알렌이 glycerol 유도 급성신부전에 회복 효과가 있을 것으로 사료된다.



## FIGURE LEGENDS

### Abbreviations

N: nucleus M: mitochondria, Ma: heavy damaged mitochondria

Mb: middle damaged mitochondria, Mc: little damaged mitochondria

\* Each scale bar on the figures equals 1  $\mu$ m.

**Fig. 5.** An electron micrograph of normal proximal tubules in mouse ( $\times 3,000$ ).

**Fig. 6.** An electron micrograph of proximal tubules at 24 hours of glycerol treated mouse ( $\times 8,000$ ).

**Fig. 7.** An electron micrograph of proximal tubules at 24 hours of glycerol and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 3,000$ ).

**Fig. 8.** An electron micrograph of proximal tubules at 48 hours of glycerol treated mouse ( $\times 4,000$ ).

**Fig. 9.** An electron micrograph of proximal tubules at 48 hours of glycerol and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 4,000$ ).

**Fig. 10.** An electron micrograph of proximal tubules at 72 hours of glycerol treated mouse ( $\times 5,000$ ).

**Fig. 11.** An electron micrograph of proximal tubules at 72 hours of glycerol and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 5,000$ ).

**Fig. 12.** An electron micrograph of proximal tubules at 96 hours of glycerol treated mouse ( $\times 4,000$ ).

**Fig. 13.** An electron micrograph of proximal tubules at 96 hours of glycerol and SQ simultaneous treated mouse ( $\times 5,000$ ).

