

돼지에서 신장 허혈 관류 손상에 미치는 환원형 L-glutathione의 효과

이재연 · 김현수 · 지현철 · 정성목 · 조성환 · 박창식 · 김명철¹

충남대학교 수의과대학

(게재승인 : 2009년 5월 27일)

The Effects of Reduced L-glutathione on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs

Jae-Yeon Lee, Hyun-Soo Kim, Hyun-Chul Jee, Seong-Mok Jeong, Sung-Whan Cho,
Chang-Sik Park and Myung-Cheol Kim¹

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract : This study was performed to evaluate the effects of reduced L-glutathione on the oxidant/antioxidant status (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), protein carbonyl and lipid hydroperoxide (LPO) concentration), renal function (blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine levels), and microscopy of renal tissues in pigs undergoing unilateral renal ischemia-reperfusion (I/R). Sixteen Landrace and Yorkshire mixed-breed pigs were divided randomly into two groups: untreated control group and reduced L-glutathione - treated group (4 mg/kg IV). Each group had 8 pigs. Pigs were unilaterally nephrectomized and the kidney was subject to 30 min of renal pedicle occlusion. Blood samples for biochemical assay were collected on days 1, 3, 5, 7, and 14 post nephrectomy. Renal I/R injury were evaluated histopathologically by the microscopic observation of renal tissue sections and biochemically by the measurement of the plasma creatinine and urea levels. Parameters of oxidative stress such as SOD, GPx, CAT, protein carbonyl and LPO were measured. The elevation of creatine and BUN levels was lower in the treated group, compared with the control group. The activities of antioxidant-enzyme were higher in the treated group, compared with the control group. In histological findings, the severity of damage in the reduced L-glutathione treated group was less when compared to the control group.

Key words : reduced L-glutathione, ischemia-reperfusion injury, antioxidant.

서 론

신장 허혈 재관류 손상은 신장 이식이나 부신 동맥류 치료 등의 경우에서 일어나는 복합적인 증상으로 이러한 손상은 후에 이식 신장의 점진적 기능 상실 및 기능 부전과 관련되어 있다(1,15). 이로 인해 발생하는 세뇨관 및 사구체 손상에 의한 급성 신부전은 술 후 높은 치사율 및 이환율의 원인이 되며, 신장 허혈에 따른 조직 내 저산소증은 reactive oxygen species (ROS)의 증가를 유도하며 이는 곧 신장의 손상을 일으키게 된다(11). 허혈 재관류 손상을 일으키는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나, 허혈 재관류에 의한 산소 자유기의 생성이 중요한 요인 중 하나인 것으로 보고되어 왔다(3). 따라서 신장 허혈 재관류 손상을 최소화 하는 것은 신장 이식 수술 후 장기간의 예후 증진에 중요하다. 허혈 재관류 손상은 biological membranes와 ROS 반응에 의해 형

성되는 생성물과 내인성 항산화물질의 수준 측정을 통해서 평가 할 수 있다(2). 산소 자유기는 허혈 재관류 시 일어나는 세포 손상의 주요 매개체 이다(5,9). 또한 이러한 산소 자유기의 생성은 anti-oxidative system의 활성화와 연관 된다. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 효소들은 산소 자유기에 대항한 세포 손상 보호에 관여 한다(14). Lipid peroxidation과 protein oxidation은 산화 손상의 중요한 지표이다(6). Lipid hydroperoxide (LPO)의 정량은 세포의 병리생리학적 관점에서의 산화 손상을 평가하는데 필수적이며 이러한 작용은 산소 자유기와 포화 또는 불포화 지질과의 강력한 반응으로 이루어진다(7). Protein carbonyl 농도는 protein oxidation의 일반적인 지표이다. 몇몇의 물질들이 신장 허혈 관류 손상의 방지를 위해 임상적으로 사용되고 있다. Glutathione은 thiol 함유 tripeptide로 산화 손상 시 세포 보호 작용으로 널리 알려진 물질이다(10).

본 실험의 목적은 산소 자유기의 포착제로 알려진 환원형 L-glutathione의 신장 허혈 재관류 손상에 대한 효과를 조직학적 검사 및 생화학적 검사를 통해 평가하기 위함이다.

¹Corresponding author.
E-mail : mckim@cnu.ac.kr

재료 및 방법

실험 동물 및 실험 군 분류

실험 동물은 체중 38.4 ± 2.5 kg 의 Landrace와 Yorkshire 혼혈 종 돼지 16 마리를 사용하였으며 허혈 대조군(n=8) 및 환원형 L-glutathione 투여군 (n=8)으로 나누어 실험 하였다. 수술 전 24 시간 절식 시켰으며 혈액 검사를 통해 신기능 평가를 실시하였다. 환원형 L-glutathione 투여 군은 수술 직전 환원형 L-glutathione (Tathion inj[®], Dong-A Co. LTD., 4 mg/kg)을 정맥 주사하였다.

전 처치와 마취

신장 허혈-재관류 손상 유발을 위한 실험 동물 마취는 전 마취제로 atropine sulfate (Atropine Sulfate[®], Huons Co., LTD., 0.04 mg/kg, IM), xylazine hydrochloride (Rompun[®], Bayer Co., LTD., 4.4 mg/kg, IM)를 투여하였고 기관 튜브 삽관을 위해 thiopental sodium (Thionyl[®] Dai Han Pharm. Co., LTD., 6 mg/kg, IV)을 투여하였다. 수술 시 감염 예방을 위한 항생제 및 진통 소염제로 ampicillin sodium (Penbrok[®], Chong Kun Dang Co., 20 mg/kg IV)과 meloxicam (Metacam[®], Boehringer Ingelheim Co., 0.2 mg/kg IV)을 수술 전 투여하였고 마취 유지는 isoflurane 2%를 사용하였다.

신장 허혈-재관류 손상 유발 및 혈액 표본 채취

개복은 정중 절개를 통해 실시하였고 좌측 신장 적출술을 실시하였다. 우측 신장은 신장 동맥 및 정맥을 분리하여 혈관 검사로 잡고 40분간 허혈을 유도한 후 재관류하였다. 폐복한 후 마취에서 각성시켰다.

각 군에서 수술 전, 후, 술 후 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일에 혈액 샘플을 채취 하였고 분리된 혈청으로부터 blood urea nitrogen (BUN) 및 serum creatinine 농도를 측정하였다 (IDEXX Vetest 8008, USA). 항산화 효소치 검사를 위해 SOD, GPx, CAT, protein carbonyl, LPO concentration을 측정하였으며 Cayman kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) 및 SynergyTM HT and KC4 (Bio-Tek[®] Instrument, Winooski, Vermont 05404-0998 USA)를 이용하였다.

조직학적 검사

수술 후 14일에 안락사를 실시하여 우측 신장 조직을 채취하였다. 조직학적 검사를 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켜, 파라핀 포매 후 5 μ m로 연속 절편 하여 HE염색을 하였다. 조직병리학적 평가를 위해 세포질 공포 형성, 세포관 세포 괴사, 염증 세포의 침윤 및 사구체 변성 정도를 0, 정상; 1, 매우 경미; 2, 경미; 3, 중등도; 4, 심함으로 분류하고 점수화하여 평가하였다.

통계처리

실험 결과는 평균치와 표준 편차를 구한 후, SPSS 프로그

램 (Release 12.0.1 for windows, SPSS Inc., USA)를 사용하여 Kruskal-Wallis 검정하였으며 Mann-Whitney U-test로 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.

결 과

혈청 BUN 측정

신기능 평가로 시간에 따른 BUN의 농도 변화는 모든 군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 유의적으로 증가하였다 ($P < 0.05$). 모든 군에서 최고 수치는 수술 후 1일에서 나타났으며 7일 내에 정상 수준으로 회복하였다(Table 1). BUN의 상승 정도는 허혈 대조군에 비해 환원형 L-glutathione 투여군에서 낮았다. 정상 수준으로의 회복 시기 역시 환원형 L-glutathione 투여군은 5일로 허혈 대조군 7일에 비해 빠른 회복을 보였다.

혈청 creatinine 측정

신기능 평가로 시간에 따른 혈청 creatinine의 변화에서는 모든 군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$). 최고 수치는 허혈 대조군과 환원형 L-glutathione 투여군에서 모두 수술 후 3일에 나타났다(Table 1). 상승 정도는 허혈 대조군에 비해 환원형 L-glutathione에서 낮았으나 군간의 유의적 변화는 없었다. 정상 수준으로의 회복 시기는 환원형 L-glutathione 투여군에서 5일로 허혈 대조군 7일 보다 빨랐다.

SOD, CAT, GPx 활성도

시간 경과에 따른 SOD 활성도의 변화는 허혈 대조군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 감소하였으나 유의적인 변화는 없었다. 환원형 L-glutathione 투여군에서는 신장 허혈-재관류 손상 후 증가하였으며 손상 후 3일 및 5일에 유의적 상승을 보였다($P < 0.05$). 시간 경과에 따른 CAT 활성도 변화는 두 군에서 모두 신장 허혈-재관류 손상 후 감소하였으나 유의적인 변화는 없었다. 시간 경과에 따른 GPx 활성도 역시 두 군에서 모두 신장 허혈-재관류 손상 후 감소하였으며 허혈 대조군에서는 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$, Table 1).

Lipid peroxidation 및 protein oxidation

시간 경과에 따른 lipid peroxidation 수치 변화에서는 허혈 대조군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 증가하였으며 손상 후 1일, 3일 및 5일에서 유의적인 상승이 있었다($P < 0.05$, Table 1). 그러나 환원형 L-glutathione 투여군에서는 신장 허혈-재관류 손상 직후 증가하였으나 1일부터 감소 하였고 손상 후 1일엔 허혈 대조군과 비교 시 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). Protein oxidation 수치 변화에서는 허혈 대조군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 증가하였으며 손상 후 3일 및 5일에서 유의적인 상승이 있었다($P < 0.05$). 환원형 L-glutathione 투여군도 시간 경과에 따른 상승은 있었으나 유의적인 변화는 없었다.

Table 1. Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), protein carbonyl (Pro), lipid hydroperoxide (LPO) data

	Group	Pre	Post	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 14
BUN	I/R	7.5 ± 1.83	8.3 ± 2.26*	68.5 ± 32.70*	64.5 ± 50.47*	44.3 ± 32.78*	24.8 ± 9.73*	16.3 ± 0.86*
	I/R+L-G	8.5 ± 1.91	11.0 ± 1.41*	56.8 ± 18.43*	42.3 ± 31.72*	21.3 ± 12.58*	14.5 ± 2.65*	15.0 ± 6.00*
Cr	I/R	1.1 ± 0.06	1.5 ± 0.10*	5.3 ± 2.03*	5.6 ± 4.42*	3.6 ± 2.09*	2.2 ± 0.88*	1.4 ± 0.12
	I/R+L-G	1.1 ± 0.13	1.3 ± 0.14	3.2 ± 0.83*	3.8 ± 3.01*	1.9 ± 0.71*	1.5 ± 0.36*	1.7 ± 0.82*
SOD	I/R	3.73 ± 0.94	3.65 ± 0.80*	3.45 ± 1.85*	3.39 ± 1.71	3.52 ± 0.65	N.E	N.E
	I/R+L-G	4.18 ± 0.64	5.13 ± 0.87	5.51 ± 1.53*	5.81 ± 1.14*	5.42 ± 1.32*	N.E	N.E
Catal	I/R	2065.3 ± 271.80	1990.1 ± 651.18	1954.5 ± 240.28	1944.9 ± 320.83	2001.5 ± 40.54	N.E	N.E
	I/R+L-G	1946.9 ± 693.55	1868.1 ± 444.81	1960.9 ± 440.79	1804.9 ± 593.87	1715.0 ± 605.06	N.E	N.E
GPx	I/R	212.35 ± 45.67	140.96 ± 90.53	142.79 ± 59.32*	130.05 ± 63.64	126.32 ± 94.86	N.E	N.E
	I/R+L-G	190.86 ± 43.46	197.91 ± 40.47	150.46 ± 27.70	165.67 ± 28.98	188.96 ± 24.69	N.E	N.E
Pro	I/R	21.41 ± 20.47	35.70 ± 14.80	53.37 ± 22.27	98.77 ± 81.06*	87.02 ± 41.22*	N.E	N.E
	I/R+L-G	20.08 ± 3.01	21.98 ± 5.11	22.84 ± 11.11	32.90 ± 11.97	35.57 ± 23.33	N.E	N.E
LPO	I/R	11.86 ± 1.77	13.22 ± 1.61	13.56 ± 1.36*	14.16 ± 2.42	13.73 ± 1.92	N.E	N.E
	I/R+L-G	12.57 ± 2.20	13.21 ± 2.19	11.37 ± 1.39a	12.82 ± 1.63	12.44 ± 1.11	N.E	N.E

Data are expressed as mean ± SD (n=8).

*Significantly different from baseline (P < 0.05).

I/R: Ischemia-reperfusion group.

I/R + L-G: Ischemia-reperfusion + reduced L-glutathione treatment group.

N.E : Not examined.

조직 병리학적 검사

Table 2에 각 군별 조직 병리학적 점수를 나타내었다. 본 실험에서는 신장 허혈-재관류 손상 후 세뇨관 괴사, 공포 형성, 사구체 변성 등의 조직학적 변화를 확인하였다. 허혈 대조군에서의 손상 정도는 중등도 1 마리 및 심함 7 마리로 평가되었고 환원형 L-glutathione 투여군은 경미 3마리 및 중등도 5 마리로 평가되었다. 두 군에서 모두 신장 수질 보다 신장 피질에서의 변성이 많았으며 특히 허혈 대조군의 경우 사구체 변성, 세뇨관 세포 괴사 및 염증 세포의 침윤이 많이 관찰 되었다(Fig 1).

고 찰

신장 허혈-재관류 손상은 장기 이식 시 가장 중요한 문제이며 초기 이식 장애 정도를 결정하는 주요 결정 인자이다. 혈액 공급 소실에 의한 허혈은 신장과 같은 대사적으로 활성도가 높은 조직에 빠른 손상을 준다(1). 허혈 후 재관류에 따른 hypoxanthine oxidation에 기인한 산소 자유기의 유의적인 상승이 발생한다. Xanthin dehydrogenase-oxidase 전환과 hypoxanthine 형성은 장기의 재 산소화에 따른 허혈-재관류 손상의 산화적 손상을 증폭시킨다(12). 또한 유리된 산소 자유기는 염증세포의 침윤과 추가적인 산소 자유기의 발생을 유도한다. 신장 허혈-재관류 손상 시 산소 자유기는 세포의 단백질, 지질 및 핵산과 반응하여 lipid peroxidation과 protein peroxidation을 일으키며 이는 이온 펌프 활성과 같은 효소 대사에 장애를 주어 세포 재생에 손상을 준다(6).

Table 2. Effect of reduced L-glutathione (4 mg/kg) pretreatment on renal morphology and histology after ischemia-reperfusion (I/R)

Groups	Frequency of scores in each group (n)					
	0	1	2	3	4	
I/R	—	—	—	1	7	(8)
I/R + L-G	—	—	3	5	—	(8)

산화적 손상 시 유발되는 superoxide anions (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH)과 같은 산소 자유기는 많은 질병에서 병리 작용에 주요한 작용을 하며 이러한 산소 자유기들은 생체 내 antioxidant defence system에 의해 제거되거나 불활성화 된다(4). 활성 산소에 생화학적으로 작용하는 효소에는 superoxide anion을 H_2O_2 로 변성시키는 SOD와 H_2O_2 를 무독화시키는 CAT, 그리고 환원형 glutathione (GSH)을 산화시키는 GPx가 있다. 이러한 효소들은 산화에 의한 스트레스 증가에 상응하여 활성화되어 작용한다(12).

본 실험에서는 신장 허혈-재관류 손상 시 LPO 및 protein carbonyl의 증가가 있었으며 이는 항산화 효소 작용을 억제하였다. Lipid peroxidation과 protein oxidation은 산화적 손상의 중요한 지표이다. 또한 본 실험에서는 SOD, GPx의 활성도가 환원형 L-glutathione 투여군에서 신장 허혈-재관류 손상 후 증가하였으며 CAT 활성도도 환원형 L-glutathione 투여군에서 신장 손상 후 감소하긴 했으나 허혈 대조군에 비

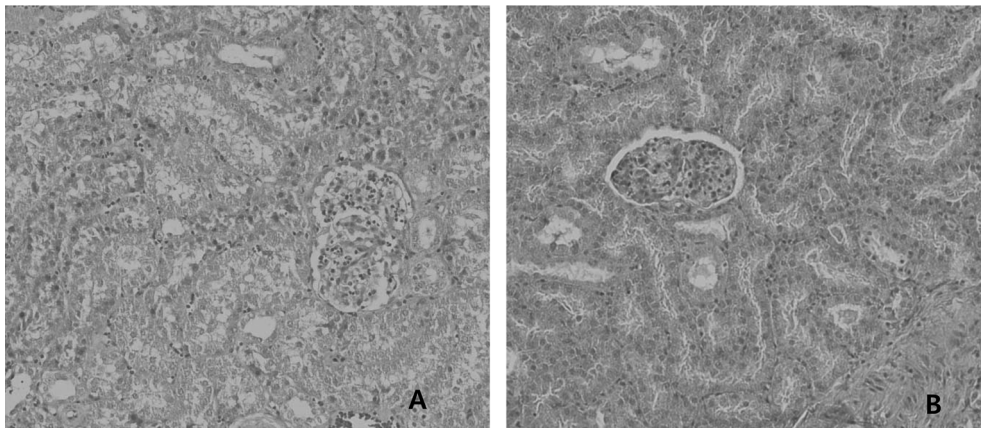


Fig 1. HE-stained sections of pig kidney ($\times 200$). (A) Kidney section of control pig shows severe damage of tubular, neutrophil infiltration, tubular necrosis and vacuole formation. (B) Kidney section of reduced L-glutathione pretreated pig shows moderate damage including tubular swelling and normal glomeruli.

해 높은 수치를 나타내었다. 이러한 항산화 효소들의 활성은 신장 기능 평가의 지표인 혈청 BUN 및 혈청 creatinine 수치와도 관련된다. 신장 허혈-재관류 손상은 혈청 BUN 및 혈청 creatinine 수치를 상승시켜 신장 기능을 손상시킨다. 본 실험에서도 신장 허혈-재관류 손상 이후 혈청 BUN 및 혈청 creatinine 수치가 유의적으로 상승하였다. 그러나 그 상승폭이 환원형 L-glutathione 투여군에서 낮게 나타났으며 정상 수준으로의 회복도 허혈 대조군과 비교하여 빨랐다. 따라서 환원형 L-glutathione 투여는 신장 허혈-재관류 손상 시 신장 기능 손상 정도를 감소시키는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 산화적 작용에 의한 손상의 중요한 지표인 LPO 및 protein carbonyl 수치에서도 유의적인 변화가 있었다. 두 군 모두 신장 허혈-재관류 손상 후 LPO 및 protein carbonyl 수치의 상승이 있었으나 환원형 L-glutathione 투여군에서 그 상승폭이 허혈 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 동물 및 임상 실험에서 재관류 시기 동안 발생하는 병리학 적 변화와 LPO 및 protein carbonyl 수치의 관련성이 이전에 보고된바 있다(13). 이러한 환원형 L-glutathione의 anti-liperoxidation 효과는 본 실험에서 환원형 L-glutathione 투여 시 신기능 손상 억제 효과를 보인 것으로 생각된다. 또한 LPO 및 protein carbonyl의 활성도는 신장 조직 손상 정도 와도 관련된다. 본 실험에서는 조직학적 검사 결과 LPO 및 protein carbonyl 활성도 변화와 상응하여 나타났다. 허혈 대조군에서의 신장 조직 손상 정도는 세뇨관 세포의 괴사 및 협착, 사구체 변성 및 염증 세포의 침윤 정도가 심각하게 나타났다. 환원형 L-glutathione 투여군에서는 그 손상 정도가 중등도로 나타났다. 특히 신장 실질에의 염증 세포 침윤의 경우 허혈 후 재관류 시 많이 발생하며 이는 허혈 손상의 일차적인 매개체가 된다. 본 실험에서는 LPO 활성도가 염증 세포 침윤의 지표로 생각되며 따라서 신장 허혈-재관류 손상 후 수치의 상승이 보였다.

본 실험에서는 환원형 L-glutathione 투여가 SOD, CAT

및 GPx와 같은 항산화 효소의 활성도를 증가시켰고 이는 신장 기능 평가의 지표인 혈청 BUN 및 혈청 creatinine 수치 상승 억제에 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 환원형 L-glutathione 투여는 신장 허혈-재관류 손상 후 나타나는 세포 내 lipid peroxidation과 protein oxidation을 억제 함으로서 실질적인 신장 세포 손상 억제에 효과가 있음을 조직병리학적 검사를 통해 확인하였다.

결 론

본 실험을 통해 돼지에서 신장 허혈 관류 시 환원형 L-glutathione의 투여가 신기능 향상에 도움을 주는 것을 생화학 적 검사 및 조직학적 검사를 통해 확인 하였다. 따라서 실질적인 임상에의 적용을 위해 vitro human cell line 또는 다른 실험 동물의 모델을 통한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국 과학 재단 우수 연구 센터 (R11-2002-100-04006-0) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Tilney NL. Initial ischemic reperfusion injury influences late functional and structural changes in the kidney. *Transplant Proc* 1997; 29: 1528-1529.
2. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; 202: 628-41.
3. Braga PC, Dal Sasso M, Zuccotti T. Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 739-46.

4. Braga PC, Dal Sasso M, Zuccotti T. Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surh* 1985; 202: 628-642.
5. Dobashi K, Singh I, Orak JK, Asayama K, Singh AK. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem* 2002; 240: 9-17.
6. Erdogan H, Fadillioğlu E, Yagmurca M, Uçar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res* 2006; 34: 41-6.
7. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad Res* 1996; 25: 57-74.
8. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-80.
9. Irmak MK, Fadillioğlu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, Yagmurca M and Gozukara ME. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct* 2003; 21: 283-289.
10. Gukasyan HJ, Kim KJ, Kannan R, Farley RA, Lee VH. Specialized protective role of mucosal glutathione in pigmented rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4427-4438.
11. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993; 16: I19-I26.
12. Michels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
13. Singh AK, Mani H, Seth P et al. Picroliv preconditioning protects the rat liver against ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2000; 395: 229-39.
14. Tibell LA, Sethson I, Buevich AV. Characterization of the heparin-binding domain of human extracellular superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1997; 340: 21-32.
15. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Alomond PS. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; 59: 962-968.