

# IgA 신증 환자들에서 신조직내 TGF-β와 TNF-α의 유전자발현에 대한 ACE Inhibitor의 영향

아주대학교 의과대학 내과학교실

김승정 · 신규태 · 마경애 · 김홍수 · 김도현

## 〈요 약〉

신질환의 진행은 신조직내 세포외기질의 축적과 관계된다고 하며, transforming growth factor-β (TGF-β)의 과생산은 세포외기질 단백질 축적을 일으키고 그 결과 병적인 섬유화를 유발한다. 많은 동물실험과 실험실 연구에서 angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitor가 TGF-β의 생성을 억제한다는 보고가 있으나 사구체신염 환자들의 신조직을 가지고 시행한 연구는 거의 없는 실정이다. TGF-β 이외에 tumor necrosis factor-α (TNF-α)도 신질환의 진행과 관계가 있다는 보고가 있어서 본 연구에서는 IgA 신증 환자들을 대상으로 신조직내 TGF-β와 TNF-α의 발현에 대한 ACE inhibitor의 영향을 관찰해 보고자 하였다. 환자들을 ACE inhibitor를 투여받은 16명(ACEI 투여군)과 투여받지 않은 23명(ACEI 비투여군)의 두 군으로 나누어 competitive RT-PCR을 시행하였고, TGF-β1과 TNF-α의 mRNA의 양을 정량하여 β-actin에 대한 비로 나타내었다. ACEI 비투여군(n=23)에서 TGF-β1 mRNA의 발현은 14.81±3.87fg/pg으로 대조군(n=11)의 2.78±0.71fg/pg에 비해 의미있게 증가되어 있었고, ACEI 투여군(n=16)에서는 4.27±0.62fg/pg으로 ACEI 비투여군에 비해 의미있게 감소되어 대조군과 그 발현이 차이가 없었다. TNF-α의 mRNA의 발현은 각각 ACEI 비투여군에서는 4.89±1.93fg/pg, ACEI 투여군에서는 2.75±1.29fg/pg, 대조군에서는 7.86±1.45fg/pg으로 세 군간에 의미있는 차이가 없었다. 결론적으로 본 연구에서는 동물실험에서만 관찰할 수 있었던 ACE inhibitor가 TGF-β의 발현을 의미있게 감소시킨다는 사실을 실제 IgA 신증 환자들의 신조직에서 확인할 수 있었다.

## 서 론

Angiotensin II(이하 ANG II)가 사구체 손상에 중요한 역할을 하며, 따라서 angiotensin converting enzyme(이하 ACE) inhibitor가 신질환의 진행을 완화시킨다는 것은 이미 널리 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. ACE inhibitor의 이러한 효과에 대한 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나 혈역학적(hemodynamic), 그리고 비혈역학적(non-hemodynamic) 기전이 둘 다 관여하리라고 생각된다<sup>3)</sup>. 혈역학적 기전에 대한 것으로

만성적으로 신손상이 가해지면 신실질의 감소를 가져 오고 연속적으로 사구체내압이 증가되며 이것이 신질환의 진행을 더욱 가속화시키게 된다. 그러므로 ACE inhibitor가 원심성 소동맥을 선택적으로 수축시키는 ANG II의 생성을 억제하여<sup>4)</sup> 사구체내압을 감소시키고 신손상을 줄일 수 있다는 것이다. 이러한 혈역학적 기전 이외에 ACE inhibitor가 어떤 cytokine의 발현을 변화시킴으로 신장 보호 작용을 나타낼 수 있다는 가설이 있다. 이러한 신손상에 관련된 cytokine으로 가장 잘 알려진 것이 transforming growth factor-β(이하 TGF-β)이다<sup>5)</sup>. 진행된 신질환은 원인질환의 종류에 관계없이 세포외기질의 과도한 축적과 신조직의 섬유화를 특징으로 하며<sup>6)</sup>, TGF-β가 과생산되는 경우 이것이 세포외기질의 합성을 증가시켜 조직의 병

책임저자: 신규태 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5  
아주대학교 의과대학 내과학교실  
Tel: 031)219-5133, Fax: 031)219-5109

적 섬유화를 일으키게 된다. 실제로 다양한 사구체 신염에서 TGF- $\beta$ 의 발현이 증가되었다는 증거들이 있는데, 당뇨병성 신증<sup>7,8)</sup>, 루푸스신염<sup>9,10)</sup>, HIV 신증<sup>11)</sup>, IgA신증<sup>12-14)</sup> 등에서 보고되어 있다. 또한 많은 동물모델과 실험실 연구에서 ACE inhibitor의 투여 후 TGF- $\beta$ 의 발현이 억제된다는 보고들이 있다. 그러나 사구체 신염 환자들을 대상으로 신조직에서 ACE inhibitor 투여 여부에 따른 TGF- $\beta$ 의 발현의 차이를 관찰한 연구는 전세계적으로 거의 없는 실정이다. TGF- $\beta$  외에 다른 cytokine으로 tumor necrosis factor- $\alpha$ (이하 TNF- $\alpha$ )는 아직 그 역할이 분명하게 밝혀져 있지 않은 cytokine으로<sup>15)</sup> IgA 신증이나 막성 사구체신염, 국소성 경화성 사구체경화증 등을 가지는 환자의 혈청과 소변에서 TNF- $\alpha$ 가 증가된 소견을 보인다는 보고들이 있으며<sup>16-18)</sup>, 쥐와 사람의 말초혈액 단핵세포를 가지고 시행한 연구에서 ACE inhibitor 투여 후 TNF- $\alpha$ 의 활성이 감소된다는 보고가 있다<sup>19)</sup>. 동물연구에서 나타나는 현상이 실제 사구체신염 환자에서는 다르게 발생할 수 있으므로, 환자들의 신조직에서 이러한 cytokine들의 발현의 변화를 관찰하는 것은 큰 의미가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 IgA 신증 환자들을 대상으로 이들의 신조직에서 TGF- $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현의 정도를 대조군과 비교하여 관찰하고, ACE inhibitor 투여가 TGF- $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현에 영향을 주는지를 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

신장조직검사를 통해 IgA 신증으로 진단된 39명의 환자들을 대상으로 하였다. 신조직 검사는 초음파 유도하에 18 G gun을 이용하여 시행하였고 이 환자들로부터 얻은 신조직을 액체질소에 즉시 동결시킨 후 곧 -70℃의 냉동고에 보관하였다. 39명의 IgA 신증 환자들 중 16명은 신조직검사를 시행하기 전에 ACE inhibitor(fosinopril, lisinopril, ramipril)를 복용하고 있었고, 첫 복용일부터 조직검사일까지의 평균 기간은 89.57±118.42일(7-365일)이었다(ACEI 투여군). 반면 나머지 23명의 환자들은 ACE inhibitor를 투여 받지 않았다(ACEI 비투여군). 그 외에도 두 군간에 나이, 성별, 평균 동맥압, 24시간 단백뇨의 정도, 혈청

크레아티닌 등을 비교하였다. 또한 신조직 소견을 WHO에서 정한 기준에 의해 WHO 1군에서 5군까지로 분류하여 비교하였다. ACE inhibitor 외의 다른 투약으로는 ACEI 비투여군중 4명의 환자에서 혈압 조절을 위해 calcium channel blocker(amlodipine이나 nifedipine)를 복용하고 있었고, furosemide를 ACEI 투여군에서 5명, ACEI 비투여군에서 3명의 환자들이 복용하였다. 신기능이 정상이며 단백뇨가 없는 11명의 신장 중앙 환자들로부터 적출된 신장중 정상부위의 신조직을 대조군으로 하였다.

### 2. 방법

#### 1) Total RNA의 분리

냉동보관 하였던 환자들의 신조직에 Trizol<sup>®</sup>(Life Technologies, MD, USA) 1mL를 첨가한 후 신조직을 분쇄하였다. 여기에 chloroform을 첨가하여 RNA를 추출해 낸 후 isopropanol로 침전시키고 이후 75% ethanol로 세척한 후 TE buffer에 용해시켰다. 분리된 RNA를 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

#### 2) Reverse transcription

총 1  $\mu$ g의 RNA에 50mM Tris-HCl(pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 각각 0.5mM의 deoxynucleoside triphosphate(dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200Unit의 Moloney murine leukemia virus(M-MLV) reverse transcriptase, 100ng의 random hexanucleotide primer를 혼합하여 총 20  $\mu$ L의 혼합물을 37℃에서 60분간 incubation하여 cDNA를 합성한 후 65℃에서 10분간 가열하여 reverse transcriptase의 불활성화를 유도하였다. cDNA에 TE buffer(pH 8.0)를 첨가하여 총 50  $\mu$ L로 만든 후 -20℃의 냉동고에 보관하였다.

#### 3) Competitive polymerase chain reaction (PCR)

$\beta$ -actin, TGF- $\beta_1$ , 그리고 TNF- $\alpha$ 의 mRNA의 양을 정량하기 위해 competitive PCR을 시행하였다(Fig. 1). Competitor는 PCR mimic construction kit(Clontech Lab, U.K.)를 사용하여 제작하였으며 이것을 연속적으로 희석하여 dilution series를 만들었다. 일정한 양의 cDNA와 농도를 아는 10  $\mu$ L의 competitor를 혼합한 후 83.5mM KCl, 16.7mM Tris-HCl(pH 8.3), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 각각 0.33  $\mu$ M의 primer(Table 1), 1U의 Taq DN polymerase,

**Fig. 1. Examples of competitive PCR.** Two rows of bands are produced by coamplification of a constant amount of the cDNA and known serial concentrations of aliquots of each competitor. A)  $\beta$ -actin, B) TGF- $\beta$ 1.

**Table 1. Sequences and Sizes of The Primers Used in PCR**

Cytokines		Sequences of primers	cDNA	Competitor
$\beta$ -actin	sense	5'-GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT-3'	350bp	442bp
	antisense	5'-GGA TGC CAC AGG ACT CCA TGC-3'		
TGF- $\beta$ 1	sense	5'-CTG CGG ATC TCT GTG TCA TT-3'	246bp	340bp
	antisense	5'-CTC AGA GTG TTG CTA TGG TG-3'		
TNF- $\alpha$	sense	5'-TGG CGT GGA GCT GAG AGA TAA-3'	175bp	222bp
	antisense	5'-GAT GGC AGA GAG GAG GTT GAC-3'		

각각 67.5  $\mu$ M dNTP를 넣어 총 25  $\mu$ L의 혼합액을 만들어 competitive PCR을 시행하였다. PCR은 Perin Elmer 9600 thermocycler(Perkin Elmer, CT, USA)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 57에서 30초간 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 20초간 primerextension과정을 반복하여 각각  $\beta$ -actin은 29 cycle, TGF- $\beta$ 1과 TNF- $\alpha$ 는 33cycle을 시행하였다. Cycle에 들어가기 전에 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 미리 가열시켰고 각 cycle이 끝난 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension시켰다. PCR 생성물을 2% NuSieve<sup>®</sup>(FMC BioProducts, USA)와 1% Ultrapure<sup>®</sup>(Life Technoloies, MD, USA) agarose gel에서 electrophoresis 시행한 후 사진기로 negative film을 얻어 denitometer로 분석하였다. Competitor DNA의 농도를 알고 있으므로 쌍으로 이루어진 target cDNA와 competitor DNA의 density의 비를 구하여  $\beta$ -actin과 TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  mRNA를 정량한 후 TGF- $\beta$ 1(fg)/ $\beta$ -actin (pg)의 비와 TNF- $\alpha$  (fg)/ $\beta$ -actin(pg)의 비를 각각 계산하였다.

### 3. 통계처리

모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 두 군간에 연속 변수의 비교는 unpaired t-test를 사용하였고 범주형 변수의 비교는 Chi-squared test를 이용하였으며, 세군간의 비교는 one way ANOVA를 사용하였고 Bonferroni 교정을 하였다. 또한 각 변수들간의 연관성을 관찰하기 위해 Pearson correlation coefficients를 이용하였다. p-value는 0.05 이하를 의미하는 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 환자들의 임상적 특성의 비교

ACEI 비투여군과 ACEI 투여군의 평균 연령은 각각 31.7 $\pm$ 3.0세, 35.6 $\pm$ 3.4세였고, 성별은 남자가 각각 61, 50%였다. 평균 크레아티닌치는 각각 1.5 $\pm$ 0.2 (0.6-5.0)mg/dL, 1.4 $\pm$ 0.2(0.7-3.2)mg/dL, 하루 평균 단백뇨는 각각 4.17 $\pm$ 0.94(0.24-16.10)g/day, 3.26 $\pm$ 0.94(0.39-14.70)g/day, 평균 동맥압은 각각 90.9 $\pm$

4.4mmHg, 94.4 $\pm$ 1.9mmHg으로 모두 두 군간에 차이를 보이지 않았다(Table 2).

## 2. 조직 소견의 국제보건기구 분류 (WHO classification)

ACEI 비투여군에서 WHO의 분류상 WHO 1군은 없었고 2군이 1명, 3군이 6명, 4군이 15명, 5군이 1명 있었다. ACEI 투여군은 WHO 1, 2, 5군은 없었고 3군이 3명, 4군이 13명으로 ACEI 비투여군과 투여군에서 차이를 보이지 않았다(Table 3).

## 3. 신조직에서 TGF- $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 발현

Competitive PCR을 이용하여 TGF- $\beta$ 1과 TNF- $\alpha$ 의 mRNA의 양을 정량할 수 있었고 둘 다  $\beta$ -actin에 대한 비로 나타내었다. ACEI 비투여군(n=23)에서 TGF- $\beta$ 1 mRNA의 발현은 14.81 $\pm$ 3.87fg/pg으로 대조군(n=11)의 2.78 $\pm$ 0.71fg/pg에 비해 의미있게 증가되어 있었고, ACEI 투여군(n=16)에서는 4.27 $\pm$

0.62fg/pg으로 ACEI 비투여군에 비해 의미있게 감소되어 대조군과 그 발현이 차이가 없었다(Fig. 2). ACEI 비투여군에서 calcium channel blocker를 사용한 환자들(n=4)의 TGF- $\beta$ 1 mRNA의 양은 17.47 $\pm$ 9.62fg/pg이며, 나머지 환자들(n=19)에서는 14.25 $\pm$ 4.34fg/pg으로 그 발현의 차이가 없었다. 한편 TNF- $\alpha$ 에 대해서는 22명의 ACEI 비투여군, 15명의 ACEI 투여군, 10명의 대조군에 대해 그 발현을 관찰하였는데, 각각 ACEI 비투여군에서는 4.89 $\pm$ 1.93fg/pg, ACEI 투여군에서는 2.75 $\pm$ 1.29fg/pg, 대조군에서는 7.86 $\pm$ 1.45fg/pg으로 세 군간에 의미있는 차이가 없었다. 역시 ACEI 비투여군에서 calcium channel blocker를 사용한 환자들(n=4)과 나머지 환자들(n=18) 사이에 TNF- $\alpha$ 의 발현의 차이는 관찰할 수 없었다(각각 7.39 $\pm$ 6.07fg/pg, 4.33 $\pm$ 2.01fg/pg).

## 4. 신조직에서의 각 cytokine들의 발현과 임상적 지표들의 연관성

모든 환자들에서 신조직의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현의 정도는 혈청 크레아티닌, 요단백 배설 정도, 평균동맥압, 조직 소견의 WHO 분류 등과 연관성이 없었다. TNF- $\alpha$ 에서도 마찬가지로 임상적 지표들과 연관성을 찾아볼 수 없었다.

Table 2. Clinical Characteristics of 39 Patients\*

	NoACEI <sup>†</sup> patients(n=23)	ACEI <sup>‡</sup> patients(n=16)
Age(years)	31.7 $\pm$ 3.0	35.6 $\pm$ 3.4
Gender(male, %)	61	50
Serum creatinine (mg/dL)	1.5 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2
Proteinuria(g/day)	4.17 $\pm$ 0.94	3.26 $\pm$ 0.94
Mean BP(mmHg)	90.9 $\pm$ 4.4	94.4 $\pm$ 1.9

\*Data are expressed as mean $\pm$ SEM

<sup>†</sup>Patients not taking ACE inhibitors

<sup>‡</sup>Patients taking ACE inhibitors

Table 3. WHO Classification of Renal Pathology

WHO <sup>*</sup> class	NoACEI <sup>†</sup> patients(n=23) (number of atients)	ACEI <sup>‡</sup> patients(=16) (number of patients)
I	0	0
II	1	0
III	6	3
IV	15	13
V	1	0

\*World Health Organization pathologic criteria

<sup>†</sup>Patients not taking ACE inhibitors

<sup>‡</sup>Patients taking ACE inhibitors

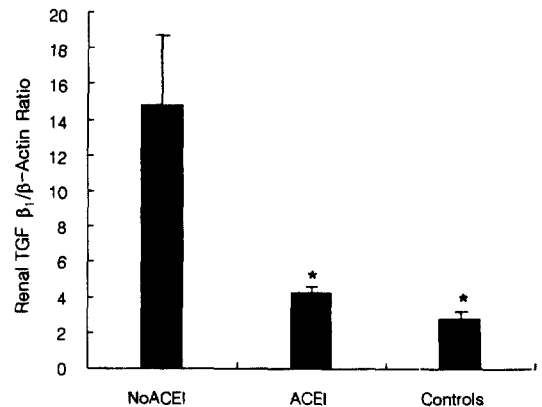


Fig. 2. The renal gene expression of TGF- $\beta$ 1 expressed as TGF- $\beta$ 1(fg)/ $\beta$ -actin(pg) in patients with IgA nephropathy not taking ACE inhibitors(NoACEI) and taking ACE inhibitors(ACEI). Controls are normal part of nephrectomized kidneys. Mean values $\pm$ SEM are given. \* $p$ <0.05 versus NoACEI(one way ANOVA).

## 고 찰

본 연구에서는 ACE inhibitor를 투여하지 않는 IgA신증 환자들에서 대조군에 비해 TGF- $\beta$ 1의 발현이 증가된 것을 관찰하였으며 이는 다른 보고들<sup>12-14)</sup>과 일치하는 결과이다. 반면 ACE inhibitor를 투여한 경우에는 정상 대조군과 가깝게 그 발현이 감소되었다. ANG II는 TGF- $\beta$ 의 생성을 촉진시키는 인자중의 하나이며, 따라서 ANG II 저해제나 ACE inhibitor를 사용하는 경우 신조직의 섬유화를 늦추고 신질환의 진행을 완화시킬 수 있다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. 많은 동물연구에서 이러한 사실을 증명하였는데, 쥐의 신절체모델에서 ANG II를 억제한 경우 신조직의 TGF- $\beta$  유전자의 발현의 증가를 막음을 보여준 연구들이 있고<sup>21, 22)</sup>, 일측 요관폐쇄를 일으킨 쥐모델에서도 ANG II를 억제한 경우에 폐쇄된 쪽 신장의 TGF- $\beta$  mRNA의 증가를 의미있게 감소시켰다<sup>23, 24)</sup>. 이외에도 실험적으로 유도한 사구체 신염에서 ANG II의 억제가 신장의 TGF- $\beta$  발현과 신손상을 효과적으로 줄였다고 하며<sup>25, 26)</sup>, 고혈압 쥐모델에서도 유사한 연구들이 있다<sup>27, 28)</sup>. 이와 같이 많은 동물 연구에서 ANG II의 억제로 TGF- $\beta$ 의 생성을 감소시키고 신질환의 진행을 완화시킬 수 있다는 것을 증명하였으나 실제 사구체신염 환자들을 대상으로 한 연구는 거의 없는 실정이다. 저자 등은 ACE inhibitor 투여 전후로 사구체신염 환자들의 말초혈액 단핵세포를 분리하여 TGF- $\beta$ 의 발현을 관찰한 바 있으며, ACE inhibitor 투여에 따른 차이를 보이지 않았었다<sup>29)</sup>. 사구체 신염 환자들의 신조직을 가지고 ANG II와 TGF- $\beta$ 의 관계를 관찰한 연구로는 단 하나의 초록 형태의 보고만이 있을 뿐이다<sup>30)</sup>. 동물에서 실험적으로 유도한 신질환에서 나타나는 현상은 실제 사람의 신질환과 차이가 있을 수 있으므로 본 연구는 큰 의의가 있다고 할 수 있다. 본 연구에서는 위에서 열거한 동물연구에서와 같이 실제로 사구체 신염 환자의 신조직에서 ACE inhibitor의 사용 후에 TGF- $\beta$ 1의 발현이 의미있게 감소한 사실을 관찰하였다.

TGF- $\beta$ 가 감소하는 기전이 ANG II의 억제로 혈압을 낮추는 것 때문인지 아닌지에 대해서는 상충되는 보고들이 있다. 혈압의 증가가 TGF- $\beta$ 의 발현을 증가시킨다는 연구로는 압력을 주어 사구체 팽창을

유도한 경우 TGF- $\beta$ 의 생성과 세포외 기질의 생성이 촉진되었다는 실험실 연구들이 있으며<sup>31, 32)</sup>, 동물연구에서는 nifedipine을 사용하여 TGF- $\beta$ 의 증가를 막았다는 보고가 있고<sup>33)</sup>, Wolf 등도 hydralazine-reserpine-hydrochlorothiazide의 3중 치료로 TGF- $\beta$ 의 증가를 방지하였다고 보고하였다<sup>27)</sup>. 이러한 연구들의 결론은 전신 고혈압이 사구체의 팽창을 일으키고 이것이 TGF- $\beta$ 의 생성을 증가시킨다는 것이다. 그러나 혈압이 TGF- $\beta$ 의 생성에 중요한 역할을 하지 않는다는 다른 연구들이 있는데, Junaid 등은 쥐 모델에서 hydralazine-reserpine-hydrochlorothiazide의 3중 치료로 TGF- $\beta$ 를 감소시키지 못한 반면, ANG II 저해제를 사용하여 TGF- $\beta$ 의 발현을 감소시켰다<sup>22)</sup>. 다른 연구에서도 전신혈압을 낮추기에는 적은 용량의 ANG II 저해제나<sup>34)</sup> ACE inhibitor로<sup>35)</sup> 신조직의 TGF- $\beta$ 의 발현의 증가를 억제시킨 보고들이 있다. 또한 사구체내압의 증가를 일으킬 수 없는 세포배양 연구의 결과들이 ANG II가 직접적으로 TGF- $\beta$ 의 발현을 증가시킨다는 가설을 뒷받침한다. 그 예로 Kagami 등은 쥐의 메산지음 세포를 ANG II와 배양시 TGF- $\beta$ 의 발현이 증가하고 ANG II 수용체 억제제가 이러한 TGF- $\beta$ 의 증가를 억제하는 것을 관찰하였고<sup>36)</sup>, Wolf 등도 쥐의 근위세뇨관 세포 배양에서 ANG II가 TGF- $\beta$ 의 생성을 촉진시켰다고 하였다<sup>37)</sup>. 본 연구에서도 ACEI 투여군과 ACEI 비투여군 사이에 혈압의 차이가 없었으므로 두 군에서 TGF- $\beta$  발현의 차이를 보인 이유가 ACE inhibitor가 혈압을 감소시켰기 때문으로는 생각되지 않는다. 따라서 이 차이는 ACE inhibitor에 의해 ANG II가 TGF- $\beta$ 의 생성을 직접적으로 촉진시키는 것을 억제했을 가능성과, 아니면 ACE inhibitor가 신장내의 renin-angiotensin 체계에 영향을 주어 전신 혈압과는 관계없이 사구체내압을 감소시켰을 가능성을 생각해 볼 수 있고, 또한 두가지 모두 작용했을 가능성도 있다. 본 연구에서 ACEI 비투여군 환자들중 4명에서 calcium channel blocker를 투여받고 있었는데, 이들이 매우 소수이고 투여받지 않은 19명과 비교했을 때 TGF- $\beta$ 의 발현이 오히려 더 높은 경향을 보여 본 연구 결과에서 calcium channel blocker의 영향은 배제해도 될 것으로 보인다.

단백뇨의 정도는 사구체 신염의 예후에 중요한 영향을 미치는 것으로 널리 알려져 있다<sup>33)</sup>. Eddy 등은

쥐모델에서 알부민의 복막내 주입으로 단백뇨를 유발한 후 신조직내 섬유화와 함께 TGF- $\beta$ 의 발현이 증가하였고, ACE inhibitor를 사용한 후 단백뇨의 감소와 더불어 TGF- $\beta$ 의 발현이 감소되는 것을 관찰하였다<sup>39)</sup>. 본 연구에서도 통계적 차이는 없었으나 ACEI 투여군과 비투여군에서 단백뇨의 정도가 각각  $3.26 \pm 3.75$ ,  $4.17 \pm 4.50$ g/day로 ACEI 투여군에서 낮았으므로 이것이 TGF- $\beta$ 1의 발현의 감소에 주는 영향에 대해서는 추후 더 연구가 필요하겠다.

본 연구에서 TGF- $\beta$ 의 발현을 관찰하는데 신조직 전체를 사용하였으므로 신조직의 어느 부위에서 TGF- $\beta$ 가 생성되는지를 관찰하지는 못했다. 그러나 과거의 보고들에서 사구체 뿐 아니라 근위 및 원위 세뇨관, 수질과 피질부의 간질을 포함한 전체 신조직에서 증가된 TGF- $\beta$ 를 발견할 수 있다고 하였고<sup>12, 21, 23, 40)</sup>, 이것은 사구체에서 생성된 TGF- $\beta$ 가 사구체역과나 세뇨관 주위 모세혈관을 통해 세뇨관간질로 퍼져 나가기 때문으로 생각된다<sup>12)</sup>. 따라서 본 연구에서처럼 전체 신조직에서 mRNA의 양을 측정하는 것도 의미가 있을 것으로 생각된다. 그러나 사구체만을 분리하여 TGF- $\beta$ 의 발현을 조사하거나 in situ hybridization, 혹은 면역조직화학 염색을 시행한다면 TGF- $\beta$ 의 생성 부위에 대한 더 정확한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

한편, TNF- $\alpha$ 의 발현은 ACE inhibitor에 영향을 받지 않았다. 역시 사구체 신염 환자들의 신조직을 가지고 TNF- $\alpha$ 의 발현에 대해 시행한 연구는 현재까지 거의 없는 상태이며, Nakamura 등이 쥐의 신장의 거대세포에서 ANG II 주입 후 TNF- $\alpha$ 의 발현을 관찰한 연구에서도 본 연구에서처럼 영향을 주지 못하였다<sup>41)</sup>. 그러나 ACE inhibitor 투여 후 TNF- $\alpha$ 의 발현이 감소된 연구<sup>19)</sup>와, 수질부 두꺼운 상행각 부위에서 추출한 세뇨관에서 ANG II의 주입 후 TNF- $\alpha$ 의 발현이 증가되었다는 보고도 있어<sup>42)</sup>, TNF- $\alpha$ 와 ANG II의 관계에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구에서는 IgA 신증 환자에서 ACE inhibitor가 신조직의 TGF- $\beta$ 1의 발현을 감소시키고 TNF- $\alpha$ 의 발현에는 영향을 주지 않음을 관찰하였다. 이와 같이 ACE inhibitor의 사용으로 신조직의 TGF- $\beta$ 1의 발현이 감소된다는 사실은, 만성 사구체신염 환자에서 신질환의 진행을 완화시키기 위해

ACE inhibitor를 사용하는 중요한 근거가 될 것이며, TNF- $\alpha$ 에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

= Abstract =

**The Effect of ACE Inhibitors on The Gene Expression of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in Renal Tissues from Patients with IgA Nephropathy**

Seung-Jung Kim, M.D., Gyu-Tae Shin, M.D.  
Kyoung-Ai Ma, M.D., Heung-Soo Kim, M.D.  
and Do-Hun Kim, M.D.

Department of Nephrology, School of Medicine,  
Ajou University, Suwon, Korea

Progressive nephropathies are characterized by the enhanced accumulation of extracellular matrix in the kidney. Overproduction of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) was shown to result in pathological fibrosis of tissue via the accumulation of extracellular matrix proteins. It has been proposed that angiotensin II stimulates the production of TGF- $\beta$ . Despite accumulating volume of data supporting the effects of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitors in the attenuation of TGF- $\beta$  in vitro and in rats, studies in humans are absolutely lacking. There is evidence that TNF- $\alpha$  expression is increased in various glomerulonephritis. The present study sought to determine the effects of ACE inhibitors on TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  in patients with IgA nephropathy. Using competitive polymerase chain reaction, TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  mRNA abundance were measured. Patients taking ACE inhibitors showed significantly lower renal TGF- $\beta$ 1 gene expression compared with patients not on these medications (ratios of TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ -actin,  $4.27 \pm 0.62$  versus  $14.81 \pm 3.87$ ,  $p < 0.05$ ), whereas no difference was noted between patients on ACE inhibitors and normal controls ( $4.27 \pm 0.62$  versus  $2.78 \pm 0.71$ ). ACE inhibitor therapy did not affect the TNF- $\alpha$  mRNA expression in renal tissue. In conclusion, we observed a significant reduction of the TGF- $\beta$ 1 expression in the kidney by ACE inhibitors, and this suggests that the effects of ACE inhibitors observed in animals can be extrapolated to patients with chronic renal disease.

**Key Words** : Angiotensin II, ACE inhibitor, TGF- $\beta$

## 참 고 문 헌

- 1) Anderson S, Rennke HG, Brenner BM : Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 77:1993-2000, 1986
- 2) Ruggenenti P, Perna A, Benini R, Bertani T, Zoccali C, Maggiore Q, Salvadori M, Remuzzi G : In chronic nephropathies, prolonged ACE inhibition can induce remission: Dynamics of time-dependent changes in GFR. *J Am Soc Nephrol* 10: 997-1006, 1999
- 3) Hollenberg N, Raij L : Angiotensin-converting enzyme inhibition and renal protection. *Arch Intern Med* 153:2426-35, 1993
- 4) Denton KM, Fennessy PA, Anderson WP : Morphometric analysis of the actions of angiotensin II on renal arterioles and glomeruli. *Am J Physiol* 262:367-72, 1992
- 5) Border WA, Noble NA : Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-92, 1994
- 6) Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA : Sustained expression of TGF- $\beta$ 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 45:916-27, 1994
- 7) Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Rousslahti E, Border WA : Expression of TGF- $\beta$  in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 90:1814-8, 1993
- 8) Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fuji Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K : Quantification of glomerular TGF- $\beta$ 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49:1120-6, 1996
- 9) Yang CW, Hsueh S, Wu MS, Lai PC, Huang JY, Wu CH, Hu SA, Chen JF, Huang CC : Glomerular TGF- $\beta$ 1 mRNA as a marker of glomerulosclerosis-application in renal biopsies. *Nephron* 77:290-7, 1997
- 10) Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA : Expression of TGF- $\beta$  isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49: 461-9, 1996
- 11) Bodi I, Kimmel PL, Abraham AA, Svekey LP, Klotman PE, Kopp JB : Renal TGF- $\beta$  in HIV associated kidney diseases. *Kidney Int* 51:1568-77, 1997
- 12) Niemir ZI, Stein H, Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R : PDGF and TGF- $\beta$  contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. *Kidney Int* 48:1530-41, 1995
- 13) Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S : TGF- $\beta$  protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 68:154-63, 1993
- 14) Taniguchi Y, Yorioka N, Masaki T, Yamashita K, Ito T, Ueda H, Yamakido M : Role of TGF- $\beta$  1 in glomerulonephritis. *J Int Med Res* 25:71-80, 1997
- 15) Sporn MB : The importance of cortex in cytokine action. *Kidney Int* 51:1352-4, 1997
- 16) Matsumoto K : Increased release of tumor necrosis factor-alpha by monocytes from patients with glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 40:148-54, 1993
- 17) Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD : Elevated levels of tumor necrosis-alpha in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis* 21:251-9, 1993
- 18) Wu TH, Wu SC, Huang TP, Yu CL, Tsai CY : Increased excretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in urine from patients with IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura. *Nephron* 74:79-88, 1996
- 19) Fukuzawa M, Satoh J, Sagara M, Muto G, Muto Y, Nishimura S, Miyaguchi S, Qiang XL, Sakata Y, Nakazawa T, Ikehata F, Ohta S, Toyota T : Angiotensin converting enzyme inhibitors suppress production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in vivo and in vitro. *Immunopharmacology* 36:49-55, 1997
- 20) Border WA, Noble NA : Interactions of TGF- $\beta$  and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31:181-8, 1998
- 21) Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dzizdek M, Cooper ME, Gilbert RE : Transforming growth factor- $\beta$ 1 and renal injury following nephrectomy in the rat: Role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 51:1553-67, 1997
- 22) Junaid A, Hostetter T, Rosenberg M : Interaction of angiotensin II and TGF- $\beta$ 1 in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 8:1732-8, 1997
- 23) Pimentel JL Jr, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A : Role of angiotensin II in the expression and regulation of TGF- $\beta$ 1 in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 48:1233-46, 1995
- 24) Kaneto H, Morrissey J, Klahr S : Increased expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation.

- Kidney Int* 44:313-21, 1993
- 25) Zoja C, Donadelli R, Corna D, Testa D, Facchinetti D, Maffi R, Luzzana E, Colosio V, Bertani T, Remuzzi G: The renoprotective properties of angiotensin converting enzyme inhibitors in a chronic model of membranous nephropathy are solely due to the inhibition of angiotensin II: Evidence based on comparative studies with a receptor antagonist. *Am J Kidney Dis* 29:254-64, 1997
- 26) Zoja C, Abbate M, Corna D, Capitanio M, Donadelli R, Bruzzi I, Oldroyd S, Benigni A, Remuzzi G: Pharmacologic control of angiotensin II ameliorates renal disease while reducing renal TGF- $\beta$  in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 31:453-63, 1998
- 27) Wolf G, Schneider A, Wenzel U, Helmchen U, Stahl R: Regulation of glomerular TGF- $\beta$  expression in the contralateral kidney of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 9:763-72, 1998
- 28) Obata JE, Nakamura T, Kuroyanagi R, Yoshida Y, Guo DF, Inagami T: Candesartan prevents the progression of glomerulosclerosis in genetic hypertensive rats. *Kidney Int* 52:229-31, 1997
- 29) 김승정, 신규태, 마경애, 김상돈, 이한민, 지석배, 김홍수, 김도현: 사구체 신염 환자들에서 말초혈액 단핵세포의 cytokine들의 유전자 발현에 대한 ACE inhibitor의 영향. *대한신장학회지* 18:52-62, 1999
- 30) Nishimura M, Okamura M, Konishi Y, Inoue K, Choi K, Yoshiok T, Negoro N, Inoue T, Kanayama Y: Effect of treatment with ACE inhibitor on TGF- $\beta$  expressions in renal biopsy from patients with IgA nephropathy [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 6:397, 1995
- 31) Riser BL, Cortes P, Heilig C, Grodin J, Ladson-Wofford S, Patterson D, Narins RG: Cyclic stretching force selectively upregulates TGF- $\beta$  isoforms in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 148:1915-23, 1996
- 32) Yasuda T, Kondo S, Homma T, Harris RC: Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 98: 1991-2000, 1996
- 33) Hamaguchi A, Kim S, Ohta K, Yagi K, Yukimura T, Miura K, Fukuda T, Iwano H: TGF- $\beta$ 1 expression and phenotypic modulation in the kidney of hypertensive rats. *Hypertension* 26: 199-207, 1995
- 34) Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Wada T, Ishimura Y, Chatani F, Iwano H: Contribution of renal angiotensin II type I receptor to gene expressions in hypertension-induced renal injury. *Kidney Int* 46:1346-58, 1994
- 35) Ruiz-Ortega M, Gonzalez S, Seron D, Condom E, Bustos C, Largo R, Gonzalez E, Ortiz E, Egido J: ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix productions in a normotensive rat model of immune complex nephritis. *Kidney Int* 48:1778-91, 1995
- 36) Kagami S, Border WA, Miller DA, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437, 1994
- 37) Wolf G, Mueller E, Stahl R, Ziyadeh F: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous TGF- $\beta$ . *J Clin Invest* 92:1366-1372, 1993
- 38) D'Amico G: Influence of clinical and histological features on actuarial renal survival in adult patients with idiopathic IgA nephropathy, membranous nephropathy, and membranoproliferative glomerulonephritis: Survey of recent literature. *Am J Kidney Dis* 20:315-23, 1992
- 39) Eddy AA, Giachelli CM, McCulloch L, Liu E: Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int* 47:1546-57, 1995
- 40) Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M, Fujishima M: TGF- $\beta$ 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 45:525-36, 1994
- 41) Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Yanagawa Y, Kohsaka T: Effect of beta(2)-adrenoreceptor activation and angiotensin II on tumor necrosis factor and interleukin 6 gene transcription in the rat renal resident macrophage cells. *Cytokine* 11: 759-65, 1999
- 42) Ferreri NR, Escalante BA, Zhao Y, An SJ, McGiff JC: Angiotensin II induces TNF production by the thick ascending limb: functional implications. *Am J Physiol* 274:F148-55, 1998