

## 신이식 환자의 말초혈액 림프구에서 Perforin, Fas-ligand와 Granzyme B의 발현

아주대학교 의과대학 신장내과학교실, 일반외과학교실\*

신규태 · 김승정 · 마경애 · 최영일 · 김정은 · 이종우  
김흥수 · 이태승\* · 오창권\* · 김도현

### 〈요 약〉

**배 경 :** 최근의 여러 연구를 통하여 신이식 환자의 급성거부반응 시에 세포독성 물질들의 발현이 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서 저자 등은 신이식 환자의 말초 혈액 림프구에서 perforin, granzyme B와 Fas ligand(FasL)의 mRNA 발현을 순차적으로 검사하여, 이들이 급성거부반응을 진단할 수 있는 지표로서 유용한지 평가하고자 하였다.

**방 법 :** 말초혈액 림프구를 신이식후 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 환자의 혈액으로부터 분리하여, perforin, granzyme B, FasL의 mRNA에 대한 발현 정도를 competitive polymerase chain reaction으로 평가하였다. 결과는  $\beta$ -Actin의 값으로 나누어 보정하였다(fg/pg). 대조군에서 perforin, granzyme B, FasL 각각의 평균값+2×표준편차를 기준상한치로 설정하였다.

**결 과 :** Perforin mRNA 발현의 평균치는 대조군(8명, 47개)에 비해 급성거부반응 군(7명, 41개)에서 현저히 높게 나타났다( $1.84 \pm 3.01$  vs  $0.71 \pm 0.48$ ,  $p=0.01$ ). 기준상한치(1.67)를 초과하는 perforin mRNA 발현의 수도 급성거부반응군에서 현저히 높았다(12/41 vs. 1/47,  $p=0.0003$ ). 급성거부반응 군에서 5명이 기준상한치를 초과하는 perforin mRNA 발현을 보인 반면(5명/7명, 71.4%), 대조군에서는 한 명만이 이러한 결과를 보였다(1명/8명, 12.5%,  $p=0.02$ ). 거부반응 0-1 일째의 perforin mRNA 발현이 연구 기간 중 가장 높게 나타났다. Granzyme B와 FasL mRNA 발현은 급성거부반응 시기와 일정한 연관성을 보이지 않았다.

**결 론 :** 본 연구에서 말초혈액 림프구의 perforin mRNA 발현이 급성거부반응시에 유의하게 증가되었으며, perforin mRNA 발현을 급성거부반응의 진단에 이용할 가능성을 제시하였다.

### 서 론

신장이식에서 급성거부반응을 조기에 정확히 진단하는 것은 이식신장의 생존을 위한 가장 중요한 요소 중의 하나이다. 이식신의 급성거부반응은 혈청 크레아티닌 수치가 상승할 때 의심할 수 있으며, 확진은 이식신 조직검사로 이루어진다. 그러나 조직검사는 위험

도가 있는 침습적인 검사법이며, 때로는 조직검사로도 거부반응을 확신할 수 없을 때가 있다. 실제로 신조직으로 침윤하는 염증세포가 있다고 하여 항상 급성거부반응으로 진단할 수 있는 것은 아니며, 조직소견은 항상 임상적 소견을 고려하여 해석하여야 한다<sup>1)</sup>. 그러므로 급성거부반응을 안전하게 정확히 진단할 수 있는 검사법의 개발이 매우 필요하다고 하겠다.

급성거부반응에서 신장 세포는 세포 독성 T 림프구에 의해 칼슘 의존성 또는 칼슘 비 의존성 apoptosis 경로를 거쳐 파괴된다. 칼슘 의존성 경로는 세포 독성 T 림프구의 세포질내 과립에 있는 perforin과 granzyme를 이용하여 이루어진다. Perforin은 표적 세포막에 통로를 형성하거나, 구멍을 만드는 단백질

\* 본 연구는 대한신장학회 Novartis 연구비(신규태) 보조로 이루어졌음.

책임저자: 신규태 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5  
아주대학교병원 신장내과  
Tel: 031)219-5133, Fax: 031)219-5109  
E-mail: gtshin@ajou.ac.kr

질로서<sup>2-4)</sup>, 삼투압에 의한 세포 용해나 granzyme에 의해 유발된 apoptosis를 이용하여 세포를 파괴한다. Granzyme은 serine protease에 속하는 단백질로서, perforin이 만든 구멍을 통해 표적 세포에 들어가서 apoptosis 경로를 활성화시킨다<sup>5)</sup>. 세포를 파괴할 수 있는 인간의 세포 독성 림프구 clone은 두 가지의 serine protease, 즉 50-kDa homodimer인 granzyme A와 27-kDa monomer인 granzyme B를 가지고 있다<sup>6)</sup>. 칼슘 비 의존성 apoptosis 경로는 tumor necrosis factor(TNF) 수용체의 일종인<sup>7)</sup> Fas receptor (Fas, CD95/Apo-1)와 TNF의 일종인 Fas ligand (FasL, CD95/Apo-1 ligand)라는 type II 세포막 단백질에 의하여 이루어진다<sup>8-11)</sup>. FasL은 주로 활성화된 T 세포나 natural killer 세포에 존재하는 반면<sup>12)</sup> Fas는 여러 조직에서 나타난다<sup>7)</sup>. 세포 독성 T 림프구의 FasL이 표적 세포의 Fas와 결합하면 표적 세포에 apoptosis가 일어난다.

이식신의 급성거부반응에서 항상 림프구가 신조직에 침윤하고, 이런 림프구가 세포를 파괴하는 주원인으로 알려져 있다. 따라서, perforin, FasL, granzyme과 같은 세포를 파괴하는 물질을 말초 혈액의 림프구에서 분석하면 급성거부반응을 진단할 수 있지 않을까 하는 의문이 최근 제기되어 왔다. 본 연구에서 저자 등은 신장이식 후 처음 12일간 신이식 환자의 말초혈액 림프구를 검사하여, 이들 물질이 급성거부반응의 지표로서 이용될 수 있는 가능성을 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

모든 연구대상 환자에서 서면 동의를 받았으며, 이식 후 2, 4, 6, 8, 10, 12일째에 혈액을 채취하였다. 환자는 수술 후 상태에 따라 급성거부반응군과 대조군으로 나누었다. 대조군에는 연구 기간 동안 임상적으로 별다른 문제를 보이지 않은 8명의 신이식 환자(생체신이식 5명, 사체신이식 3명)가, 급성거부반응군에는 연구 기간 동안 급성거부반응을 경험한 7명의 환자(생체신이식 4명, 사체신이식 3명)가 포함되었다. 이들에게서 모두 88개의(급성거부반응군 41개, 대조군 47개) 혈액 검체를 얻었다. 면역억제제로 cyclosporin A, prednisolone과 mycophenolate mofetil 또는

azathioprine이 사용되었고, monoclonal 혹은 polyclonal antibody 투여를 받은 환자는 없었다. 거부반응은 혈청 크레아티닌의 지속적 상승, cyclosporin A 혈청농도, 이식신 초음파 및 이식신 스캔 등의 임상적 기준 또는 조직학적 검사에 의해 진단하였고, 항거부반응치료에 대한 신기능 호전으로 확진하였다. 항거부반응치료는 methylprednisolone 500 mg을 3일 동안 매일 1회 정주 후, prednisolone을 경구로 감량하면서 투여하는 것으로 하였다.

### 2. RNA 분리

말초혈액 림프구를 헤파린 처리된 혈액으로부터 Ficoll-Paque<sup>®</sup>(Sigma, MO, USA) gradient 방법으로 분리한 다음, Trizol<sup>®</sup>(Life Technologies, MD, USA)에 용해시켰다. RNA를 chloroform을 가하여 추출한 후, isopropanol로 침전시키고, 75% ethanol로 세척 후, TE buffer에 용해 시켰다. 분리된 RNA는 spectrophotometry로 정량 하였다.

### 3. Reverse transcription(RT)

1  $\mu$ g의 RNA를 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 10 mM DTT, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 units Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 100 ng random hexanucleotide primers, 각각 0.5 mM 의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하는 20  $\mu$ L의 반응 혼합물에서 cDNA로 역전사 하였다. 반응 혼합물은 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 65°C에서 10분 동안 RT 효소를 비활성화 시켰다. cDNA는 TE buffer(pH 8.0)로 부피를 50  $\mu$ L로 채운 후 -20°C에 보관하였다.

### 4. Competitive polymerase chain reaction (PCR)

mRNA의 정량화를 위해  $\beta$ -actin, perforin, granzyme B, FasL의 competitor(Competitive DNA Construction Kit<sup>®</sup>, Takara Biomedicals, Japan)를 이용하여 PCR을 시행하였다(Table 1). 각 cDNA 일정량을 연속적인 여러 농도의 해당 competitor 10  $\mu$ L와 함께 83.5 mM KCl, 16.7 mM Tris-HCl(pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.33  $\mu$ M의 각  $\beta$ -actin<sup>13)</sup>, perforin<sup>14)</sup>, granzyme B<sup>15)</sup>, FasL<sup>16)</sup> primer (Table 1), 1 U Taq DNA polymerase, 67.5  $\mu$ M의

Table 1. Competitive PCR Primers and Competitors

Primer	Sequence	Primer location	cDNA(bp)	Competitor(bp)
$\beta$ -actin	5'-GGTCACCCACACTGTGCCCAT-3'	2139-2159	350	442
	5'-GGATGCCACAGGACTCCATGC-3'	2563-2583		
Perforin	5'-CAGTACAGCTTCAGCACTGAC-3'	496-516	176	242
	5'-ATGAAGTGGGTGCCGTAGTTG-3'	651-671		
Granzyme B	5'-TGCAGGAAGATCGAAAGTGCG-3'	3360-3380	180	242
	5'-GAGGCATGCCATTGTTTCGTC-3'	4163-4183		
FasL	5'-AAATAGGCCACCCCAGTCCAC-3'	389-409	295	242
	5'-TTCCCCTCCATCATCACCAGA-3'	673-683		

각 dNTP를 포함하는 15  $\mu$ L 반응 용액에 넣어 PCR을 하였다.  $\beta$ -actin은 29 cycle, perforin과 granzyme은 30 cycle, FasL은 33 cycle의 PCR을 Perkin Elmer 9600 thermocycler<sup>®</sup>(Perkin Elmer, CT, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은, 94 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 57 $^{\circ}$ C에서 30초간 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 20초간 primer extension으로 하였다. PCR 이전에 검체를 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 미리 예열하였고, 증폭 후 72 $^{\circ}$ C에서 다시 5분간 extension을 추가하였다. 증폭산물은 ethidium bromide를 포함하는 2%/1% Nusieve/agarose<sup>®</sup> gel에서 전기영동을 한 후, 사진으로 결과를 확인하였다(Fig. 1). PCR 증폭 산물의 농도는 사진 필름을 laser densitometry를 이용하여 분석하였다. 대상 물질 cDNA와 competitor의 농도비를 y축에, competitor의 농도를 x축에 표시하는 방법으로 cDNA의 농도를 산출하였다. 최종 값은 perforin, granzyme B, FasL 농도를 (fg)  $\beta$ -actin 농도로(pg) 나누어 보정한 값으로 하였다.

### 5. 통계처리

모든 결과는 평균값 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. Unpaired t-test나 paired t-test를 사용하여 두 군간의 연속 변수를 비교하였다. Chi-square test로 각 군의 빈도 차이를 비교하였다. p값은 0.05 미만을 통계학적으로 유의한 것으로 하였다. mRNA 발현의 비특이적 변화 범위를 결정하기 위해, 대조군에서 각 물질의 평균값+2 $\times$ 표준편차를 계산하여 비특이적 변화의 기준 상한치로 하였다<sup>17)</sup>.

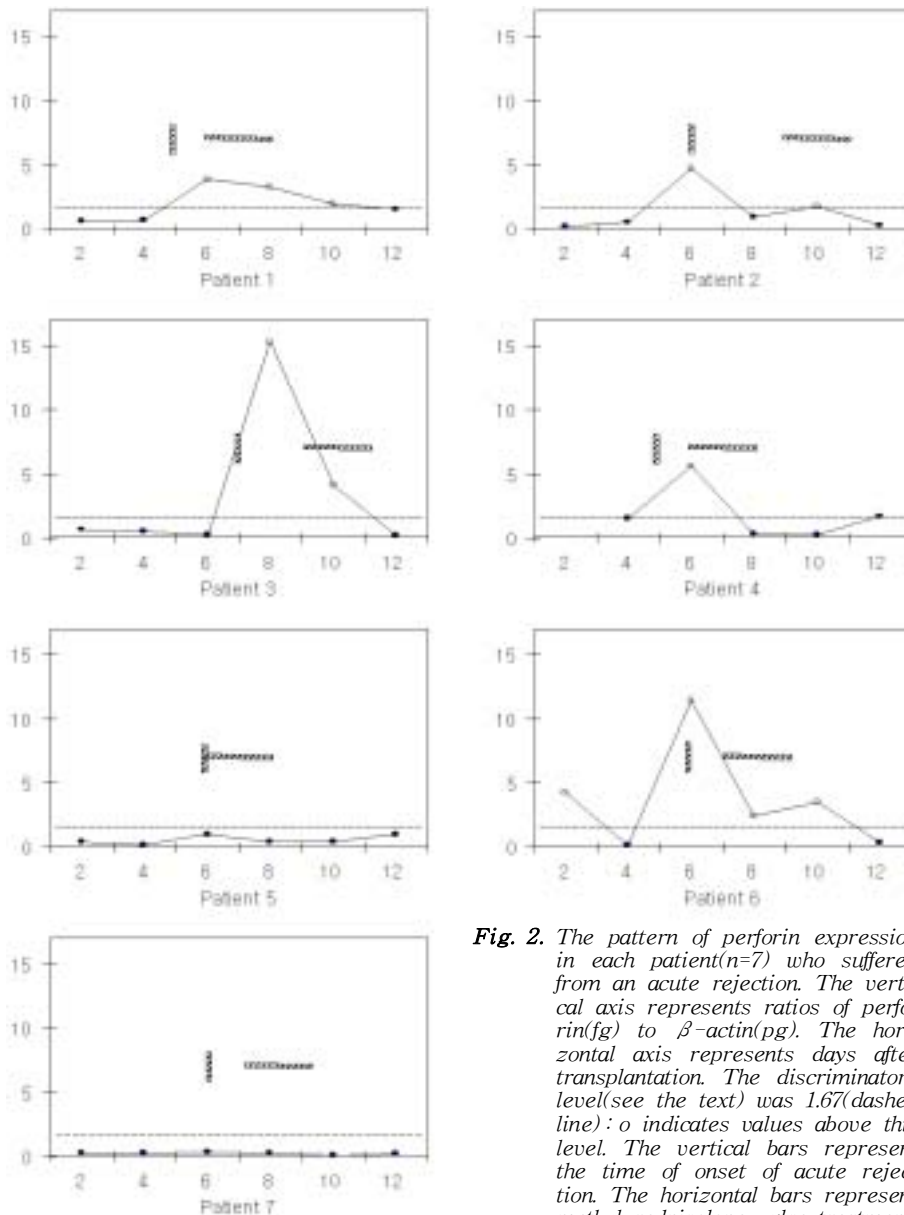
Fig. 1. Competitive PCR. 123 bp DNA ladder was used as a size marker.

## 결 과

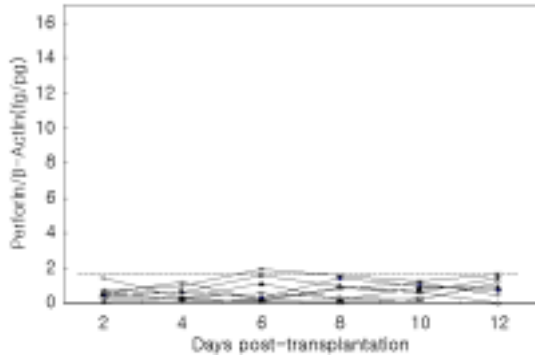
### 1. Perforin

모든 검체를 비교하였을 때, 급성거부반응군의(41개) perforin mRNA 발현이 대조군(47개) 보다 현저히 높았고 표준 편차가 상당히 커서 perforin 유전자 발현이 환자마다 시기에 따라 많은 변화가 있음을 알

수 있었다( $1.84 \pm 3.01$  vs  $0.71 \pm 0.48$ ,  $p=0.01$ ). 기준 상한치는 1.67이었고, 이를 초과하는 perforin mRNA 발현은 급성거부반응 군의 41개의 검체 중 12개에서, 대조군에서는 47개의 검체 중 1개에서만 볼 수 있었다( $p=0.0003$ ). 급성거부반응군의 기준 상한치를 초과하는 검체 중 11개는 급성거부반응의 시작시에 혹은 그 후에 관찰되었다(Fig. 2). 기준 상한치를 초과하는 perforin mRNA 발현을 보이는 환자의 수는 거부반



**Fig. 2.** The pattern of perforin expression in each patient( $n=7$ ) who suffered from an acute rejection. The vertical axis represents ratios of perforin(fg) to  $\beta$ -actin(pg). The horizontal axis represents days after transplantation. The discriminatory level(see the text) was 1.67(dashed line): o indicates values above this level. The vertical bars represent the time of onset of acute rejection. The horizontal bars represent methylprednisolone pulse treatment.



**Fig. 3.** The pattern of perforin expression in control patients(n=8). The dashed line indicates the discriminatory level(see the text).

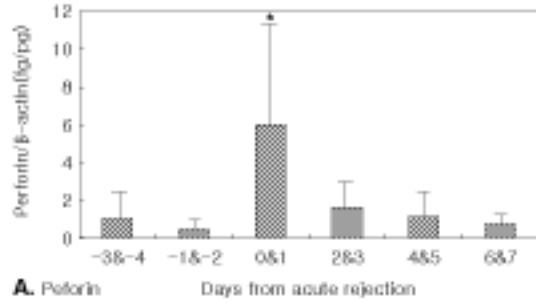
응군 7명 중 5명(71.4%)이었다. 이들 환자 모두는 급성거부반응 초기, 즉 거부반응이 일어난 0-1일째에 이들 값의 상승을 보였다(Fig. 2). 반대로 대조군에서는 오직 한 명(12.5%)에서만 이 기준 상한치보다 높은 perforin 발현을 보였다( $p=0.02$ )(Fig. 3). 연구 기간 중 perforin mRNA 발현이 가장 높았던 시기는 급성 거부반응 0-1일째였다(Fig. 4).

### 2. Granzyme B

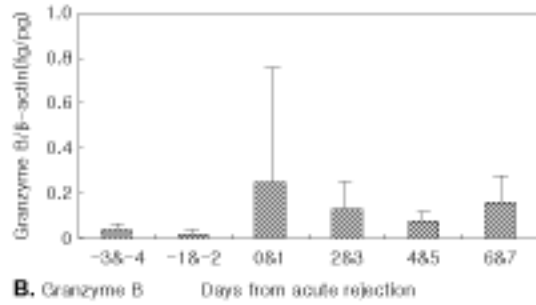
모든 검체를 비교하였을 때, 급성거부반응 군과 대조군 사이에서 granzyme B mRNA의 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다( $0.12 \pm 0.25$  vs  $0.08 \pm 0.06$ ,  $p=0.36$ ). 기준 상한치는 0.2였다. 이 값을 넘는 경우는 급성거부반응군 중 2명에서 뽑은 3개의 검체에서, 대조군의 경우는 2명의 환자에서 뽑은 2개의 검체에서 각각 관찰되었다. 급성거부반응 시기와 granzyme B mRNA 발현은 일정한 연관성을 보이지 않았다.

### 3. FasL

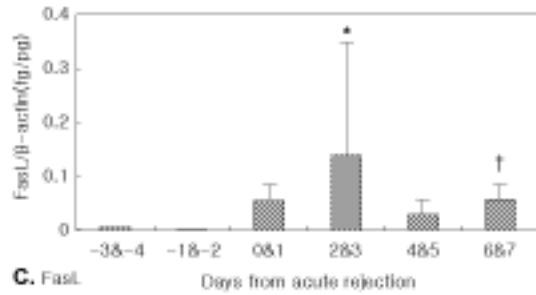
급성거부반응군과 대조군은 FasL의 mRNA 발현에 있어서 차이를 보이지 않았다( $0.05 \pm 0.10$  vs  $0.04 \pm 0.06$ ,  $p=0.63$ ). 급성거부반응군 중 한 검체에서만 기준 상한치인 0.16을 넘는 값이 관찰되었고, 급성거부반응과 연관된 특이한 변화 양상을 보이지 않았다. FasL의 발현은 급성거부반응 시작 전보다 시작 후에 더 높은 경향을 보였다(Fig. 4).



**A. Perforin**



**B. Granzyme B**



**C. FasL**

**Fig. 4.** The gene expression of cytotoxic molecules in the acute rejection group(Mean±SD). Day 0 was defined as the day when the concentration of serum creatinine started to rise. Panel (A) perforin: \* $p<0.05$  versus days -1 & -2, 2 & 3, 4 & 5 and 6 & 7 (paired T test), Panel (B) granzyme B, Panel (C) FasL: \* $p<0.05$  versus days -3 & -4 and -1 & -2, † $p<0.05$  versus days -3 & -4 and -1 & -2(paired T test).

## 고 찰

본 연구에서 말초혈액 림프구의 perforin 유전자 발현은 급성거부반응과 연관되어, 특히 거부반응 시작 시점에서 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 반면에, granzyme B와 FasL의 유전자 발현은 급성거부반응

시기와 일정한 연관성을 보이지 않았다.

최근의 보고에 따르면 perforin, granzyme B와 FasL 발현은 심장<sup>18, 19</sup>, 폐<sup>20</sup>, 신장<sup>21-23</sup> 같은 이식장기의 급성거부반응시에 증가하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, Suthanthiran 등<sup>23</sup>은 신장조직 granzyme B 발현이 신이식 후 급성거부반응과 밀접한 상관 관계가 있음을 보고하였다. 다른 보고에서도 급성거부반응을 보이는 신이식 환자<sup>24</sup>와 마우스 이식심장의 거부반응시<sup>25</sup>에 이식장기에서 FasL 발현의 증가를 보고하였다. Strehlau 등<sup>26</sup>은 perforin, granzyme B, FasL 등이 이식신의 급성거부반응 동안 조직에서 증가함을 보여주었다. 한편, 이러한 현상에는 급성거부반응 시에 이식 장기 내에 침윤하는 활성화 된 림프구가 주된 역할을 하는 것으로 보이며, 실제 Griffiths 등<sup>27</sup>은 granzyme A와 perforin을 발현하는 림프구가 급성거부반응시에 이식 심장 조직에 침윤하는 것을 관찰하였다. 또 다른 보고에서도 granzyme mRNA<sup>21</sup>와 granzyme 단백질<sup>22</sup>이 급성거부반응시에 이식신에 존재하는 세포독성 T림프구에 발현됨이 관찰되었다. 이러한 연구들에 기초하여, 급성거부반응에서 조직 침윤 림프구와 더불어 말초혈액 림프구에서의 세포독성 물질 증가에 대한 가능성이 제기되어 왔다. 이러한 가능성이 사실이라면, 말초 혈액의 세포독성 물질 증가는 조직의 세포독성 물질 증가를 반영하게 되고, 이것을 급성거부반응을 진단하는 데 이용할 수 있을 것이다. 이와 같은 가능성을 부인하는 연구들도 있는 데, 세포독성 물질이 거부반응 조직에서 국소적으로 만들어 질 가능성과, 말초 혈액과 이식 장기에서 림프구의 group 조성이 다르다는 점등이 그 것이다<sup>28, 29</sup>. 그러나 어쨌든 몇 연구에서, 이식신의 거부반응 시에 말초 혈액 림프구에서 세포독성 물질의 발현의 증가가 나타남을 보고하였다. Vasconcellos 등<sup>30</sup>은 급성거부반응 시에 신조직검사와 동시에 채혈된 말초혈액 림프구에서, perforin, FasL, granzyme B의 유전자 발현이 증가함을 관찰하였다. Rukavina 등<sup>31</sup>은 거부반응시에 말초혈액 CD8+ T 림프구에서의 perforin 발현의 증가를 cytofluorimetric assay를 이용하여 확인하였다.

본 연구에서 저자는 신이식 후 12일 동안 연속적으로 신이식 환자의 혈액을 검사하였고, competitive RT-PCR을 사용하여 급성거부반응시에 perforin mRNA 발현이 유의하게 증가함을 관찰하였다. 이러

한 현상은 혈청 크레아티닌 상승을 보인 당일에 혹은 그 이후에 관찰할 수 있었다. 이렇게 크레아티닌 보다 perforin mRNA 상승이 늦은 경향을 보이는 것은, T 림프구 매개 세포독성이 이식 장기에 침윤된 T 림프구에서는 초기에 나타나는 반면, 말초혈액 T 림프구에서는 이식 장기의 조직이 파괴된 후 나타난다는 이전 연구의 결과와 일치한다 할 수 있다<sup>28</sup>. 또한 본 연구에서 methylprednisolone 투여 후 perforin mRNA 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었던 바(Fig. 2) 이는 Rukavina 등<sup>31</sup>의 연구에서도 같은 결과를 보였다.

반면, granzyme B와 FasL은 저자 등이 설정한 기준에 합당한 급성거부반응의 지표로 사용될 수 있는 특이적 변화를 나타내지 않았다. 말초혈액 림프구와 이식장기 침윤 림프구의 조성이 다른 것을 고려할 때<sup>28, 29</sup>, 본 결과가 급성거부반응시에 이식 장기에서 granzyme B와 FasL의 발현의 증가를 보였던 이전 연구 결과와 상충된다 할 수는 없다. 다만 말초혈액 림프구에서도 perforin, granzyme B, FasL 모두의 증가를 보였던 Vasconcellos 등<sup>30</sup>의 연구와는 일부 상이한 결과인 것이 사실이나, 이것은 혈액 채취의 시점, 림프구 분리 방법 등이 다른 것이 그 원인이라 추정된다. 또한 본 연구에서는 대조군에서 연구 물질들이 비특이적으로 변화하는 범위를 설정하여 연구 결과를 분석한 바, 이 또한 그들 연구와 다른 점이라고 할 수 있다. 급성거부반응 후기에 FasL이 증가하는 양상을 보이는 데 이는 이시기에 증가된 세포 독성 림프구의 활성을 억제하기 위해 CD4+ 림프구의 FasL 발현이 증가된 결과라고 생각해 볼 수 있다.

본 연구의 문제점으로는 다음과 같은 것을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 급성거부군 환자가 7명으로서 앞으로 더 많은 환자에서 연구 결과를 확인할 필요가 있다는 것이다. 또한 여러 번 PCR을 반복하거나 northern blot 등으로 결과를 확인하는 것이 좀 더 정확한 결과를 위해 필요하다는 것이다. 둘째, ATN, cyclosporine 독성, 요로폐쇄 등 다른 크레아티닌 상승의 감별 진단도 연구에 포함되어야 할 것이다. 물론 이런 질환들에서는 림프구의 역할이 없으므로, 말초 혈액 림프구에서의 세포 독성 물질의 변화가 있을 가능성이 없을 것으로 추정된다. 셋째, 매일 혈액을 채취하는 것이 거부 반응과의 시간적 관계 파악에서 격일제 보다 더 나을 것은 당연한 사실이나, 본 연구에서는 현실적 어려움 때문에 그렇게 하지 못 했다는

것이다.

요약하면, 본 연구는 말초혈액 림프구에서의 perforin의 RT-PCR 분석이 이식 후 처음 2주 내에서 이식신 급성거부반응을 진단하는 방법으로 사용될 수 있음을 제시하였다. 따라서 이러한 검사는 혈청 크레아티닌이 증가하여 급성거부반응이 의심될 때나, 신조직검사에도 불구하고 명확한 진단이 나오지 않을 때 도움이 될 수 있을 것이다. 특히, 이식신 조직검사 없이 항거부 반응치료가 시행 될 때 급성거부반응에 대한 임상적 조건을 뒷받침하는 데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서 말초혈액 림프구의 perforin mRNA 발현이 급성거부반응 시에 유의하게 증가되었으며, perforin mRNA 발현을 급성거부반응의 진단에 이용할 가능성을 제시하였다.

= Abstract =

**The Expression of Peforin, Fas-ligand, and Granzyme B in Peripheral Blood Lymphocytes of Renal Allograft Recipients**

Gyu-Tae Shin, M.D., Seung-Jung Kim, M.D.  
Kyung-Ai Ma, M.D., Youngil Choi, M.D.  
Jung-Eun Kim, M.D., Jong-Woo Lee, M.D.  
Heungsoo Kim, M.D., Tae-Seung Lee, M.D.\*  
Chang-Kwon Oh, M.D.\* and Dohun Kim, M.D.

*Department of Nephrology, General Surgery\*,  
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

**Background:** Previous findings demonstrated that the expression of cytotoxic effector molecules is increased in acute rejection of renal allografts. In the present study, we serially examined the gene expression of perforin, granzyme B and Fas ligand(FasL) in peripheral blood lymphocytes(PBLs) of renal allograft recipients to assess the potential of their expression as a marker of acute rejection.

**Methods:** PBLs were isolated from blood samples taken on days 2, 4, 6, 8, 10 and 12 after transplantation. Competitive PCR was performed to evaluate the abundance of mRNA of perforin, granzyme B and FasL. The mean value of each molecule plus 2 SD for the control group was set as a discriminatory level.

**Results:** When all measured samples were compared, perforin expression was significantly higher in patients with acute rejection than in the control

group( $1.84 \pm 3.01$  versus  $0.71 \pm 0.48$ ,  $p=0.01$ ). The percentage of perforin expression exceeding the discriminatory level was also significantly higher in patients with acute rejection( $p=0.0003$ ). Five patients in the rejection group(5/7, 71.4%) showed perforin expression exceeding the discriminatory level, while only 1 patient in the control group did so(1/8, 12.5%)( $p=0.02$ ). Perforin expression of days 0 and 1 of rejection crisis was the highest over the study period. No consistent pattern of granzyme B and FasL expression was identified in relation to rejection crisis.

**Conclusion:** Gene expression of perforin by PBLs was upregulated in accordance with acute rejection, thus offering the possibility that it may be utilized as a marker of acute rejection. (**Korean J Nephrol 2002;21(3):414-422**)

**Key Words:** Perforin, Granzyme B, Fas-ligand, Acute rejection, Renal transplantation

참 고 문 헌

- 1) Curtis JJ, Julian BA, Sanders CE, Herrera GA, Gaston RS: Dilemmas in renal transplantation: When the clinical course and histological findings differ. *Am J Kidney Dis* **27**:435-440, 1996
- 2) Lowrey DM, Hameed A, Lichtenheld M, Podack ER: Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine(interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Res* **48**:4681-4688, 1988
- 3) Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, Podack ER: Structure and function of human perforin. *Nature* **335**:448-451, 1988
- 4) Persechini PM, Young JDE, Almers W: Membrane channel formation by the lymphocyte pore forming proteins: comparison between susceptible and resistant target cells. *J Cell Biol* **110**:2109-2116, 1990
- 5) Nakajima H, Henkart PA: Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. *J Immunol* **152**:1057-1063, 1994
- 6) Krahenbuhl O, Rey C, Jenne D, Lanzavecchia A, Groscurth P, Carrel S, Tschopp J: Characterization of granzymes A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **141**:3471-3477, 1988
- 7) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S:

- The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* **148**:1274-1279, 1992
- 8) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody(anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169**:1747-1756, 1989
  - 9) Rouvier E, Luciani MF, Golstein P: Fas involvement in calcium independent T cell mediated cytotoxicity. *J Exp Med* **177**:195-200, 1993
  - 10) Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* **16**:39-43, 1995
  - 11) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**:1169-1178, 1993
  - 12) Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S: Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* **154**:3806-3813, 1995
  - 13) Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kaku-naga T: Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:6133-6137, 1985
  - 14) Shinkai Y, Yoshida MC, Maeda K, Kobata T, Maruyama K, Yodoi J, Yagita H, Okumura K: Molecular cloning and chromosomal assignment of a human perforin(PFP) gene. *Immunogenetics* **30**:452-457, 1989
  - 15) Haddad P, Clement MV, Bernard O, Larsen CJ, Degos L, Sasportes M, Mathieu-Mahul D: Structural organization of the hCTLA-1 gene encoding human granzyme B. *Gene* **87**:265-271, 1990
  - 16) Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Bradley S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH: Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* **181**:71-77, 1995
  - 17) Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, Forsythe JL, Proud G, Taylor RM, Shenton BK: The value of posttransplant monitoring of interleukin(IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* **59**:333-340, 1995
  - 18) Clement MV, Haddad P, Soulie A, Benvenuti C: Perforin and granzyme B as markers for acute rejection in heart transplantation. *Int Immunol* **3**: 1175-1181, 1991
  - 19) Legros-Maida S, Soulie A, Benvenuti C, Wargnier A, Vallee N, Berthou C, Guillet J, Sasportes M, Sigaux N: Granzyme B and perforin can be used as predictive markers of acute rejection in heart transplantation. *Eur J Immunol* **24**:229-233, 1994
  - 20) Clement MV, Legros-Maida S, Israel-Biet D, Carnot F, Soulie A, Reynaud P, Guillet J, Gandjibakch I, Sasportes M: Perforin and granzyme B expression is associated with severe acute rejection. Evidence for in situ localization in alveolar lymphocytes of lung-transplanted patients. *Transplantation* **57**:322-326, 1994
  - 21) Lipman ML, Stevens AC, Bleackley RC, Helder-man JH, McCune TR, Harmon WE, Shapiro ME, Rosen S, Strom TB: The strong correlation of cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection. *Transplantation* **53**:73-79, 1992
  - 22) Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, ten Berge IJ, Hack CE, Weening JJ: Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* **47**:70-77, 1995
  - 23) Suthanthiran M: Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int* **51**:15-21, 1997
  - 24) Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao VK, Suthanthiran M: Molecular executors of cell death-differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* **62**:1860-1866, 1996
  - 25) Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC: Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune responses? *Transplantation* **60**:221-224, 1995
  - 26) Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB: Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:695-700, 1997
  - 27) Griffiths GM, Namikawa R, Mueller C, Liu CC, Young JD, Billingham M, Weissman I: Granzyme A and perforin as markers for rejection in cardiac transplantation. *Eur J Immunol* **21**:687-693, 1991
  - 28) Tilney NL, Strom TB, Macpherson SG, Carpenter CB: Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats.



- Transplantation* **20**:323-330, 1975
- 29) Bachetoni A, Lionetti P, Cinti P, Alo P, Molajoni ER, Di Tondo U, Barnaba V, Alfani D, Cortesini R: Homing of CD4+ CD56+ T lymphocytes into kidney allografts during tubular necrosis or rejection. *Clin Transplantation* **9**:433-437, 1995
- 30) Vasconcellos LM, Asher F, Schachter D, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB: Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* **66**:562-566, 1998
- 31) Rukavina D, Balen-Marunic S, Rubesa G, Orlic P, Vujaklija K, Podack ER: Perforin expression in peripheral blood lymphocytes in rejecting and tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation* **61**:285-291, 1996
-