



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**동일조건변경허락.** 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2  
0  
0  
6  
年  
2  
月

2006年 2月  
博士學位論文

博  
士  
學  
位  
論  
文

사이클로스포린 유발성 신독성에 대한  
**green tea polyphenol의 예방 효과**

사  
이  
클  
로  
스  
포  
린  
유  
발  
성  
신  
독  
성  
에  
대  
한  
녹  
차  
폴  
리  
페  
놀  
의  
예  
방  
효  
과

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 汀 仁

金  
汀  
仁

사이클로스포린 유발성 신독성에 대한  
**green tea polyphenol의 예방 효과**

**The Protective Effects of Green Tea Polyphenol  
on Cyclosporine-A Induced Nephrotoxicity**

2006年 2月 日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 汀 仁

사이클로스포린 유발성 신독성에 대한  
**green tea polyphenol**의 예방 효과

指導教授 丁 鐘 勳

이 論文을 醫學博士學位 申請 論文으로 提出함

2005年 11月 日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 汀 仁

# 김정인의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	홍순표	인
위원	조선대학교 교수	정춘해	인
위원	조선대학교 교수	이병래	인
위원	조선대학교 교수	정종훈	인
위원	조선대학교 교수	김현리	인

2005年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

## 목 차

도표 목록 . . . . .	ii
ABSTRACT . . . . .	iii
서론 . . . . .	1
재료 및 방법 . . . . .	4
결과 . . . . .	7
고찰 . . . . .	16
결론 . . . . .	24
참고문헌 . . . . .	26

## 도표 목록

### 표 및 그림 목차

Table 1. Effects of green tea polyphenol on serum creatinine and blood urea nitrogen in CsA-treated rats -----	11
Table 2. Effects of green tea polyphenol on serum aldosterone and potassium in CsA-treated rats -----	12
Table 3. Antioxidant effects of green tea polyphenol in CsA-treated rats -----	13
Figure 1. Effects of green tea polyphenol on CsA-induced lipid peroxidation in the kidneys of rats -----	14
Figure 2. Light microscopic findings in the kidneys of rats(PAS staining) -----	15

## ABSTRACT

### **The Protective Effects of Green Tea Polyphenol on Cyclosporine A- Induced Nephrotoxicity**

Kim, Jung In

Adviser; Chung, Jong Hoon M.D., PhD

Department of Internal Medicine,

Graduate School of Chosun University

#### *Purpose*

Cyclosporine A (CsA) is a potent and effective immunosuppressive agent, but use is frequently accompanied by severe nephrotoxicity. The causes for the renal toxicity of CyA have not fully elucidated. Recently, the interest of many researchers has been pointed to minimize these effects by pharmacological interventions. Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), has potent antioxidants. For the aims we tested whether the administration of green tea polyphenol prevents the development of CyA-induced nephrotoxicity.

#### *Method*

The rats (n=20) were divided into 4 groups (n=5/group); group 1 (control group) rats were intra peritoneal (IP) injected 0.9% saline solution, group 2 (CsA group) received CsA 30 mg/Kg body weight daily for 21days by IP injection, group 3 (CsA



+L-NAME group) received at the same dose above in addition to L-NAME 12 mmol/L daily by intramuscular injection. The group 4 (CsA + green tea polyphenol group) received CsA 30 mg/Kg body weight daily for 21 days by IP injection in addition to green tea polyphenol 100mg/Kg by intramuscular injection. At last day, upon sacrifice of the rats, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, potassium and aldosterone were measured and nephrectomy was done for morphological study, malondialdehyde and antioxidative enzyme analysis.

### ***Results***

There were significant increased serum urea nitrogen (BUN) ( $48.5 \pm 8.5$  mg/dL), serum creatinine ( $1.1 \pm 0.60$  mg/dL), malondialdehyde ( $3.09 \pm 0.20$  nmol/mL protein) and serum aldosterone ( $10.2 \pm 3.5$  ng/dL) in group 2 compared to group 1 ( $P < 0.01$ ). Serum BUN ( $1.10 \pm 0.082$  mg/dL), serum creatinine ( $0.51 \pm 0.045$  mg/dL) and malondialdehyde ( $1.21 \pm 0.34$  nmol/mg protein) were significantly reduced in group 3 compared to group 2 ( $p < 0.01$ ), but serum aldosterone and potassium levels were no change. Serum BUN ( $23.1 \pm 5.27$  mg/dL), serum creatinine ( $0.51 \pm 0.045$  mg/dL), malondialdehyde ( $0.89 \pm 0.32$  nmol/mg protein) and serum aldosterone ( $12.02 \pm 4.63$  ng/dL) were significantly reduced in group 4 compared to group 2 ( $p < 0.01$ ), but serum potassium level was no changes. In the histologic examination, there were proximal tubular necroses and mild interstitial inflammation in the kidneys of rats in group 2 but no significant pathologic changes in group 4 and group 3.

### ***Conclusion***

Green tea polyphenol protect against CyA induced nephrotoxicity in the rats.

Reduction of oxidative stress and lipid peroxidation and aldosterone levels may be responsible for the protective effect of Green tea polyphenol on CyA-induced structural and functional alternations of the kidney.

**Key words**

Green tea polyphenol, cyclosporine A, nephrotoxicity, aldosterone, Lipid peroxidation

## I. 서론

사이클로스포린은 1980년대 처음 소개되면서 장기 이식, 특히 신장 이식의 1년 생존율을 획기적으로 올린 약제로 스테로이드와 함께 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 면역 억제제이다<sup>1)</sup>. 사이클로스포린은 11개의 아미노산으로 이루어진 분자량이 1203인 면역 억제제로서<sup>2)</sup> 작용 기전은 T 림프구의 세포질 내에 존재하는 cyclophilin 과 결합한 후 phosphatase 의 한가지인 calcineurin 의 기능을 억제하여, nuclear factor of activating T cell(NFAT)이 세포질 내에서 핵 안으로 이동하여 IL-2 유전자를 활성화 시킬 수 없도록 함으로써 면역 억제제의 기능을 나타낸다.

사이클로스포린 사용으로 발생하는 부작용으로 널리 알려진 것은 신독성으로 사이클로스포린의 사용에 중요한 제한 요인이 되고있다. 사이클로스포린의 신독성을 일으키는 기전은 여러 가지로 알려져 있는데, 주로 신장내 미세 혈관의 수축으로 인해 신혈류량이 감소하고 특히 사구체 구심성 세동맥의 수축으로 신혈관 저항이 증가되어 사구체 여과율이 감소되며, 신세뇨관으로의 혈류 감소로 인해 신세뇨관의 손상을 초래한다<sup>3, 4)</sup>. 이밖에 사이클로스포린 신독성에 지질 과산화(lipid peroxidation)가 관여하며<sup>5, 6, 7)</sup> 특히 반응성 산소종의 생성 증가와 지질의 과산화의 증가, 산화 스트레스 자체가 사이클로스포린 신독성의 원인중의 하나로 추정된다. 사이클로스포린을 장기간 투여시 발생할 수 있는 신독성은 임상적 독성과 조직학적 신독성이 있다. 임상적 독성은 사구체 여과율의 감소, 혈중 크레아티닌치의 상승 등으로 사이클로스포린의 용량을 감소시키면 대부분 정상화된다.

그러나 조직학적 독성은 임상 독성이 나타나지 않는 예에서도 나타날 수도 있고, 임상 소견으로 조직 변화를 예측할 수 없는 경우도 흔하며, 대부분 점진적으로 비가역적인 변화를 가져온다.

Nitric oxide (NO)는 제 2 전령 물질의 하나로 세포질 내에서 L-arginine 의 guanidino nitrogen 으로부터 L-citrulline 을 합성하는 과정에서 생성되며 다양한 기능을 가지며<sup>8-11)</sup>, 특히 신장 내에서 사구체 혈관 평활근의 긴장도를 이완시키고<sup>12)</sup>, 세뇨관에서의 sodium 재흡수를 억제하며<sup>13,14)</sup>, 메산지움 세포의 수축 및 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다<sup>15,16)</sup>. 그러나 병적인 조건하에서 다양한 cytokine 에 의하여 사구체 메산지움 세포 및 활성 단핵구와 대식 세포, 혈관 평활근 세포 등에 존재하는 iNOS 경로가 활성화 됨으로써 국소적으로 다량의 NO 가 생성되는 경우에는 오히려 신장의 손상을 유발한다.<sup>17, 18)</sup>

녹차 성분 중 하나인 Polyphenol 은 flavanols, flavandiols, flavonoids 그리고 phenolic acids 등을 포함한다<sup>19)</sup>. 특히, flavanols 은 녹차의 주요 성분으로 epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epicatechin, gallic acid 그리고 catechin 등으로 구성되어 있다. 그 중에서 EGCG 는 강력한 항산화 물질로 간접적으로 iNOS 와 같은 “pro-oxidant” enzyme 의 작용을 억제한다고 알려져 있었으나<sup>20)</sup> 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 실험 동물을 대상으로 사이클로스포린 단독 투여, 사이클로스포린과 L-NAME 와 병용 투여, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 와 병용 투여하여 쥐의 신장에서 사이클로스포린 유발성 신독성에 대한 예방 효과를 관찰하고

신손상의 기전으로 알려진 NO 에 의한 지질 과산화(lipid peroxydation)와 알도스테론과의 연관성을 밝히고자 하였다.

사이클로스포린 투여에 의한 신손상의 지표로는 혈청 BUN 과 크레아티닌을 측정하였고, 지질 과산화에 미치는 영향을 알아보는 지표로 신장 조직의 malondialdehyde 및 항산화 효소 활성도를 측정하였으며, 혈청에서 알도스테론과 칼륨 값을 동시에 측정하여 green tea polyphenol 이 사이클로스포린 신독성 기전과 완화 및 예방 효과에 어느 정도 효과가 있는지를 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. Green Tea Polyphenol

녹차 추출물은 전남 보성산이며 녹차로부터 hot-water extract 방법을 이용하여 추출하였다. 구성 성분은 polyphenol (57%), amino acid (11%), 유리당 (maltose, fructose, glucose) (9%), inorganic substance (kallium, calcium, magnesium) (16%) caffeine (1%)이다. 이중 polyphenol 의 구성요소는 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (28.0%), (-)-epigallocatechin (15.0%), (+)-gallocatechin (14.8%), (-)-epicatechin (7.0%), (+)-catechin (3.5%), (-)-gallocatechin 3-O-gallate (9.6%), (-)-epicatechin 3-O-gallate (4.6%)이었다.

### B. 실험용 rats 준비와 처치

실험용 rats 은 Spague-Dawley 로 수컷 20 마리이며 몸무게는 200-250gm 이었다. 실험군은 4 군으로 분류하였는데 1 군은 Control(n=5) 군으로 생리식염수를 복강에 투여하였고, 2 군 (n=5)은 매일 사이클로스포린 50mg/Kg 을 복강 내로 21 일간 투여하였으며, 3 군 (n=5)은 동일량의 사이클로스포린을 복강 내로 투여하면서 L-NAME (N-nitro-L-arginine-methylester, iNOS inhibitor, Sigma) 12mmol/L 을 근육 주사하였고, 4 군 (n=5)은 동일량의 사이클로스포린을 복강 내로 투여하면서 green tea polyphenol 을 100mg/Kg 을 근육 주사하였다. L-NAME 와 green tea polyphenol 을 근육 주사한 이유는 혈중 농도를 보다 안정하게 유지하고 사이클로스포린과의 직접적인 약리 작용을 방지하기 위해서였다.

사이클로스포린 혈중 trough 농도는 실험 마지막날 abbott monoclonal Fluorescence

polarization immunoassay TDX 방법으로 측정하였다. 실험 마지막 날에 rats 를 개복하여 하부 복부 대동맥을 통하여 실험에 필요한 채혈을 하고, 신장을 적출하였다. 조직의 채취를 위한 조작은 ice jar 에서 실시하여 조직의 손상을 최소화하였으며 -70°C 상태로 냉동시켜 보관하였으며 이들의 검사는 정한 같은 날에 실시하여 오차를 없애도록 하였다. 형태학적 검사를 위하여 저장된 조직을 신조직 1gm 당 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 9 배량을 가하고 ice jar 에서 분쇄하였다. 이 homogenate 를 600 x g 에서 10 분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 다시 10,000 x g 에서 30 분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 mitochondria 분획을 취하여 malondialdehyde 를 측정하였다. Malondialdehyde 측정은 Buege 등 3)의 방법을 이용하여 working TCA-TBA-HCL reagent 를 사용하여 측정하였다. glutathione(GSH)은 Ellman 방법을 이용하였으며 신조직의 homogenate 에서 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)을 각각 측정하였다.

### C. 병리 조직학적 검사

형태학적인 변화는 광학 현미경 검사를 실시하였다. 표본은 절반씩 분할하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 다음 파라핀 블록을 제작하고 신장 조직은 3-4  $\mu$ m 의 박편을 만들어 hematoxylin & eosin(H&E) 및 periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 실시하고  $\times 100$  와  $\times 400$  현미경 시야에서 관찰하였다.

#### D. 통계분석

얻어진 결과의 통계 분석은 SPSS(Statistical Package for Social Science v 10.0)를 이용하였으며, 모든 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 기술하였다. 각 군간의 평균치의 비교는 Mann-Whitney test 와 Kruskal-Wallis test 를 이용하였고, 표본들의 평균값은 95% 신뢰구간으로 설정하였다.



### III. 결과

#### 1. cyclosporine A 혈중 농도

21 일간 사이클로스포린 단독 투여군과 사이클로스포린과 L-NAME (iNOS inhibitor, N-nitro-L-arginine-methylester) 병용 투여군, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군간의 사이클로스포린 혈중 농도는 사이클로스포린 단독 투여군이  $5432 \pm 1089 \text{ ng/mL}$  이었고, 사이클로스포린과 L-NAME 병용투여군은  $5621 \pm 1289 \text{ ng/mL}$  이었으며, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군  $5765 \pm 1320 \text{ ng/mL}$  로 통계학적으로 차이가 없었다( $p < 0.05$ ).

#### 2. 신기능 검사 지표에 대한 효과

신기능 검사 지표로서 혈청 BUN, creatinine 을 측정하였다 (ADVIA 1650, Bayer, USA). 정상 대조군에서 혈청 BUN 은  $20.1 \pm 1.29 \text{ mg/dL}$  이었고 혈청 creatinine 은  $0.32 \pm 0.055 \text{ mg/dL}$  이었다. 혈청 BUN 치는 사이클로스포린 단독 투여군은  $48.5 \pm 4.95 \text{ mg/dL}$  으로 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 사이클로스포린과 L-NAME 병용 투여군에서는  $1.10 \pm 0.082 \text{ mg/dL}$  이었고, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군은  $23.1 \pm 5.27 \text{ mg/dL}$  로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 의의있게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 혈청 creatinine 도 사이클로스포린 단독 투여군에서는  $1.10 \pm 0.082 \text{ mg/dL}$  로 정상

대조군에 비하여 유의있게 증가하였으며, L-NAME 병용 투여군은  $0.51 \pm 0.045 \text{mg/dL}$  와 green tea polyphenol 병용 투여군은  $0.48 \pm 0.084 \text{mg/dL}$  로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ , Table 1).

### 3. 혈중 알도스테론과 혈청 칼륨 농도에 대한 효과

모든 실험군에서 혈청 알도스테론 (Quantum, Parkard, USA) 농도와 혈청 칼륨 (ADVIA 1650, Bayer, USA) 농도를 측정하였다. 정상 대조군에서 혈청 알도스테론 값은  $7.94 \pm 3.72 \text{ng/dL}$  이고 혈청 칼륨 농도는  $10.5 \pm 1.48 \text{mmol/L}$  이었다. 혈청 알도스테론 농도는 사이클로스포린 단독 투여군은  $12.02 \pm 4.63 \text{ng/dL}$  로 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 사이클로스포린과 L-NAME 병용 투여군은  $11.81 \pm 2.71 \text{ng/dL}$  로 사이클로스포린 단독 투여군과 유의한 차이를 보이지 않았고, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군에서는  $8.16 \pm 4.39 \text{ng/dL}$  으로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 혈청 칼륨 농도는 L-NAME 병용 투여군은  $10.0 \pm 0.48 \text{mmol/L}$  과 green tea polyphenol 병용 투여군은  $9.9 \pm 0.34 \text{mmol/L}$  로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의한 차이는 없었다(Table 2).

### 4. 신장 조직의 malondialdehyde 에 대한 효과

지질 과산화 지표로서 신피질의 mitochondria 의 malondialdehyde(nmol/mg protein) 를 측정하였다. Malondialdehyde 농도는 정상 대조군에서는  $0.71 \pm 0.21 \text{nmol/mg}$

protein 이었으며, 사이클로스포린 단독 투여군에서는  $3.09 \pm 0.20 \text{ nmol/mg protein}$  로 정상 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다. 사이클로스포린과 L-NAME 병용 투여군은  $1.21 \pm 0.34 \text{ nmol/mg protein}$  과 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군은  $0.89 \pm 0.32 \text{ nmol/mg protein}$  로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의있게 감소하였고( $p < 0.01$ ) 정상 대조군에 비해서는 차이가 없었다(Figure 1).

## 5. 항산화 효소에 대한 효과

항산화 효과 대한 지표로서 glutathione(GSH), catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)를 각각 측정하였다. GSH 는 사이클로스포린 단독 투여군에서  $131 \pm 6.2$  로 정상 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군에서는  $201 \pm 12.3$  로 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의하게 증가되었으나( $p < 0.05$ ) 정상 대조군에 비해서는 더 낮은 수치를 보였다. 이밖에 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST) 활성도가 사이클로스포린 단독 투여군에서는 정상 대조군에 비하여 유의하게 감소되었으며( $p < 0.05$ ), L-NAME 병용 투여군과 green tea polyphenol 병용 투여군에서 사이클로스포린 단독 투여군에 비해서 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ , Table 3).

## 6. 신장 병리 조직 검사 결과

사이클로스포린 단독 투여군에서는 근위 세뇨관들이 위축되었으며 이들 주변으로 섬유화와 염증 세포들이 침윤되어 있었다. 그러나 L-NAME 병용 투여군과 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 이러한 소견들을 보이지 않았으며 정상 대조군과 유사한 소견을 보였다(Figure 2).

**Table 1. Effect of green tea polyphenol on serum creatinine and blood urea nitrogen in CsA-treated rats**

	<b>Serum BUN (mg/dL)</b>	<b>Serum Creatinine (mg/dL)</b>
<b>Group 1 (Control)</b>	20.1± 1.29	0.32± 0.055
<b>Group 2 (CsA)</b>	48.5± 4.95*	1.10± 0.082*
<b>Group 3 (CsA + L-NAME)</b>	25.7±7.08**	0.51±0.045**
<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>	23.1±5.27**	0.48±0.084**

Data are expressed as mean±SD. CsA: Cyclosporine-A, L-NAME (N-nitro-L-arginine-methylester, iNOS inhibitor), BUN: blood urea nitrogen. \*p<0.01 as compared to group 1 . \*\* p<0.01 as compared to group 2.

**Table 2. Effects of green tea polyphenol on serum aldosterone and potassium in CsA-treated rats.**

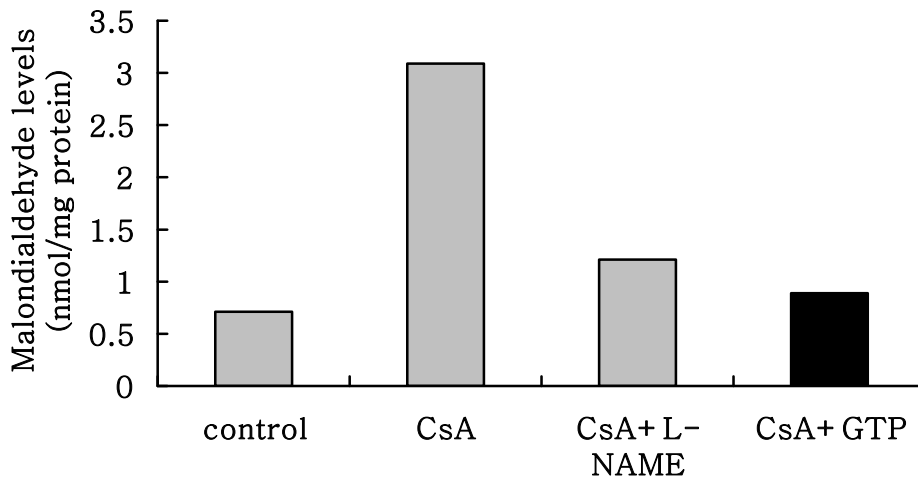
	<b>Serum aldosterone (ng/dL)</b>	<b>Serum potassium (mmol/L)</b>
<b>Group 1 (Control)</b>	7.94 ± 3.72	10.5 ± 1.48
<b>Group 2 (CsA)</b>	12.02 ± 4.63*	9.4 ± 0.26
<b>Group 3 (CsA + L-NAME)</b>	11.81 ± 2.71	10.0 ± 0.48
<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>	8.16 ± 4.39**	9.9 ± 0.34

Data are expressed as mean±SD. CsA: Cyclosporine-A, L-NAME (iNOS inhibitor: inducible nitric oxide synthase inhibitor). \*p<0.01 as compared to group 1. \*\*p<0.01 as compared to group 2.

**Table 3. Antioxidant effects of green tea polyphenol in CsA-treated rats**

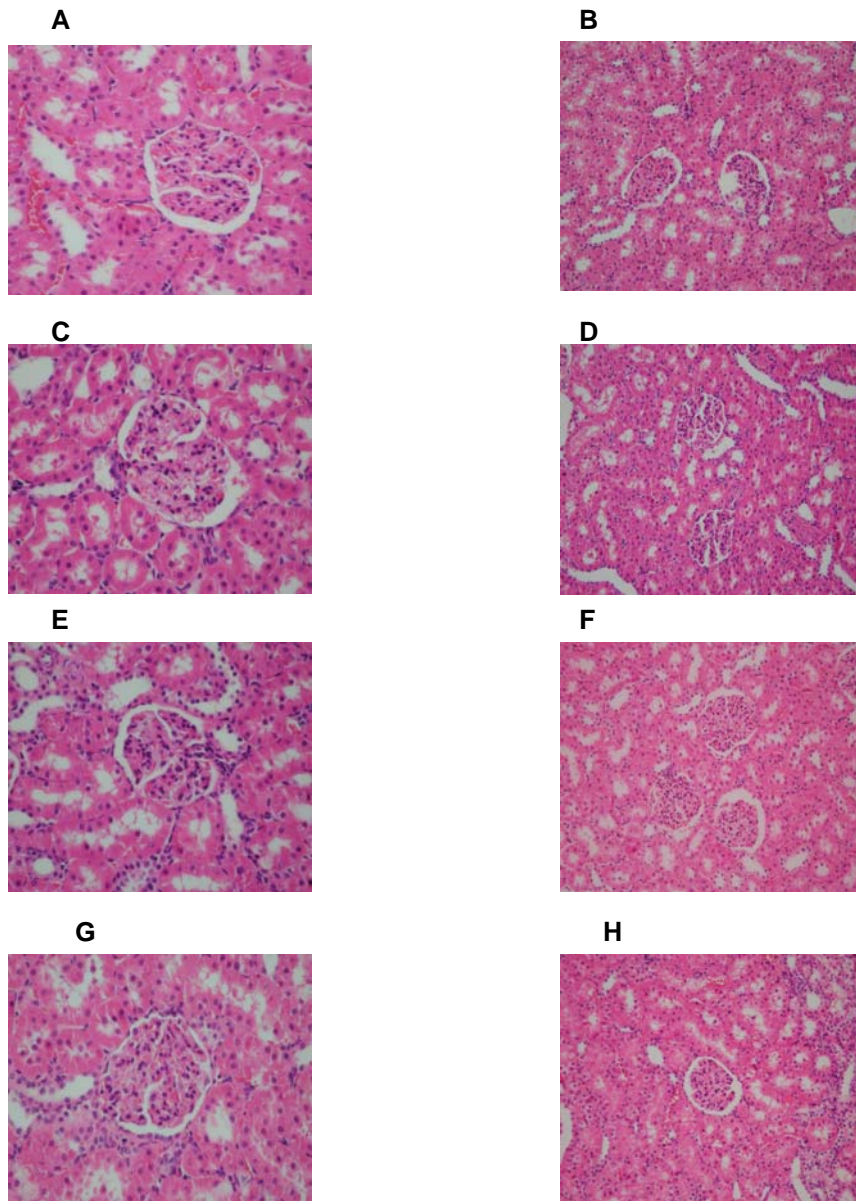
<b>Parameter</b>	<b>Group 1 (Control)</b>	<b>Group 2 (CsA)</b>	<b>Group 3 (CsA + L- NAME )</b>	<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>
<b>GSH</b>	240 ± 8.0	131 ± 6.2*	183 ± 11.5**	201 ± 12.3**
<b>Catalase</b>	64.7 ± 3.2	42.5 ± 2.0*	55.4 ± 2.2**	59.8 ± 2.3**
<b>SOD</b>	55.5 ± 1.5	30.7 ± 1.1*	50.1 ± 1.2**	57.8 ± 1.7**
<b>GPx</b>	160.4 ± 8.5	115.1 ± 7.5*	148.7 ± 8.1**	170.1 ± 9.2**
<b>GR</b>	15.3 ± 0.33	5.88 ± 0.22*	9.21 ± 0.28**	12.1 ± 0.29**
<b>GST</b>	120 ± 7.4	99 ± 8.8*	115 ± 5.1**	118 ± 6.5**

CsA: Cyclosporine-A, L-NAME (iNOS inhibitor: inducible nitric oxide synthase inhibitor) GSH: glutathione, SOD: superoxide dismutase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase, GST: glutathione-S-transferase. \* p<0.05 as compared to group 1. \*\* p<0.05 as compared to group 3.



**Figure 1. Effects of green tea polyphenol on CsA-induced lipid peroxidation in the kidneys of rats.** The malondialdehyde levels increased in cyclosporine-A treated group but significantly decreased in CsA plus L-NAME and CyA plus green tea polyphenol group. \*  $p < 0.01$  compared to control group. \*\*  $p < 0.01$  compared to cyclosporine-A treated group.





**Figure 3. Light microscopic findings in the kidneys of rats(PAS staining).** (A, B) 0.9% saline injected control group. (C, D) CsA treated group. (E, F) CsA plus L-NAME (iNOS inhibitor) treated group. (G, H) CsA plus green tea polyphenol treated group. Microscopic magnification (A, C, E, G) 400×, (B, D, F, H) 100×. There are proximal tubular necrosis and mild interstitial inflammation in the kidneys of rats after CsA treatment(C, D) but no significant pathologic changes in CyA plus green tea polyphenol treated group (E, F) and L-NAME treated group (G, H).

## IV. 고찰

본 연구는 사이클로스포린 투여 후 rats 에서 발생한 신독성에 대해 green tea polyphenol 의 예방 효과를 관찰하였다. 신장 손상의 정도를 알아보기 위해 rats 혈액에서 BUN, creatinine 를 측정하였고, 혈청 알도스테론과 칼륨 농도를 측정하여 신독성에 미치는 영향을 관찰하였다. 신장에서 지질 과산화 손상 지표로 malondialdehyde 를 측정하였으며, 항산화 효과를 파악하기 위해 항산화 효소들을 측정하였다. 또한 rate 신장의 조직학적 검사를 실시하여 형태학적으로도 급성 세뇨관 괴사 및 염증 소견의 호전 여부를 관찰하였다.

강력한 면역 억제제로써 장기 이식의 성공률을 획기적으로 높인 사이클로스포린은 1 년 생존율을 사이클로스포린 사용 이전의 30-50%에서 80%까지 증가시켰다. 하지만 5 년 생존율이 60%미만으로 낮은 이유중의 하나가 CyA 이나 FK506 과 같은 calcinuerin inhibitor immunosuppressant 의 주요한 부작용인 신독성으로 인하여, 이식후 환자 치료를 위하여 사용하는데 있어서 중요한 제한 요인이 된다<sup>21, 22</sup>). 사이클로스포린의 신독성에 대해서는 아직 확실한 기전은 밝혀지지 않는 상태이나 혈관 내피 세포 이상과 연관성이 있으며 동맥 혈관 경화와 고혈압의 악화와 연관이 있다.

정상 신장에서는 세포외 기질(extracellular matrix)의 합성과 분해가 역동적인 평형 상태에 있어 일정한 상태를 유지하지만, 신장의 섬유화는 과도하게 세포외 기질이 많이 생성되거나<sup>23, 24</sup>), 혹은 생성된 기질이 효과적으로 분해가 되지 않아<sup>25</sup>) 세

포외 기질이 축적됨으로써 섬유화가 발생한다. Mayer-Lehnert 와 Schrier<sup>26)</sup>에 의하면 사이클로스포린이 혈관세포에서  $Ca^{2+}$ 이 세포로 유입되는 곳을 자극하여 arginine vasopressin-sensitive  $Ca^{2+}$  ion pool 이 증가되어 혈관이 수축된다고 하였고, scherrer 등<sup>27)</sup>은 사이클로스포린이 교감신경 활성도를 증가시키고 시냅스 전후의 혈관 반응을 증가시켜 혈관 수축이 일어난다고 하였으나 혈중에 카테콜라민의 증가가 증명되지 않았다. Truong 등<sup>28)</sup>은 사이클로스포린을 투여하면 신장에서 혈류 역동학적인 변화가 생겨 이로 인한 신장의 혈류 감소가 신장 섬유화의 기전이라고 하였으며, 반면에 Nast 등<sup>29)</sup>과 Benigni 등<sup>30)</sup>은 신장의 혈류 변화 없이 사이클로스포린이 직접적인 섬유화 작용을 일으킨다고 하였다. Benigni 등<sup>30)</sup>은 사이클로스포린을 투여한 후 축적된 세포에서 분비되는 물질이나 성장 인자가 섬유화에 관련이 있을 것이라고 주장하였다. 사이클로스포린 관련성 세동맥 병증은 특징적으로 세동맥 벽을 따라 결절성의 단백질 환상으로 침착되는데 이 단백질은 IgM 이나 보체로 구성되어 있고 약 20%에서는 섬유소도 관찰된다. 세동맥병증은 레닌이 풍부한 부위를 침범하여<sup>31)</sup> 세동맥병증이 악화되고 괴사가 심할수록 레닌 양성 세포가 감소한다. 혈관 병변의 발생은 사이클로스포린 trough 치 및 용량과 관계가 있으며, Palestine 등<sup>32)</sup>은 17 명의 포도막염 환자에서 사이클로스포린의 치료 기간이 길면 약을 끊어도 혈관 병변이 지속될 빈도가 높다고 보고하여 사이클로스포린 투여 기간과 혈관 병변의 관련성을 간접적으로 증명하였다.

사이클로스포린에 의한 세포 독성 기전 중의 하나로 반응성 산소종의 역할이 제시되고 있다<sup>33,34)</sup>. 인체의 대사 과정에서 발생하는 이 반응성 산소종 (reactive

oxygen species; ROS)은 여러 가지로 다양한 작용을 나타낸다. 즉 고농도에서는 세포에 직접적인 독성을 나타내지만<sup>35)</sup>, 낮은 농도에서는 세포 신호 전달 분자로 작용하거나 유전자의 전사 인자에 영향을 미치며<sup>36, 37)</sup>, 효소의 활성화에도 영향을 미치고<sup>38)</sup>, 세포의 증식을 촉진<sup>39)</sup>, 또는 apoptosis 를 유도하는 등<sup>40,41)</sup> 다양한 작용을 한다. 반응성 산소종과 섬유화의 관계를 보면 반응성 산소종을 배양 중인 혈관간 세포에 투여하면 collagen III, IV 와 TGF- $\beta$  의 mRNA 발현을 증가시키고<sup>38, 42, 43)</sup>, 반응성 산소종의 대사물인 페록시아질산염 (peroxynitrite)은 섬유모세포에서 MMP(matrix metalloproteinase)의 해독 후 활성화도 (post-translational activity)를 억제한다<sup>44-46)</sup>.

NO 연구의 시초는 19 세기로 거슬러 올라가는데, 당시 nitroglycerin 등의 organic nitrate 는 협심증에 진통 효과가 있는 것으로 알려져 있었다. 1980 년대 초 NO 는 혈관 이완 효과를 갖는 endothelial-derived relaxing factor (EDRF)가 혈관의 내피 세포에서 분리됨이 관찰되었고, 이 인자의 정체는 NO 임이 밝혀졌으며, NO 가 혈압 조절의 중요한 인자임이 제시되었다. 1980 년 Furchgott 와 Zawadzki<sup>47)</sup>가 혈관 내피 세포가 있어야만 혈관 확장 인자에 의하여 혈관이 acetylcholine 에 반응하여 이완된다는 사실을 처음으로 보고하였으며, 그 이후 이 매우 불안정하고 잘 확산되는 혈관 확장 인자의 생물학적 기능이 일산화질소의 기능과 매우 흡사하다고 알려지게 되었다. 1985 년 Stuehr 와 Marletta<sup>48)</sup>는 포유류 세포에서 일산화질소가 생성된다고 처음으로 보고한 이후 쥐의 활성화된 거대세포에서 nitrite(NO<sub>2</sub>)와 nitrate(NO<sub>3</sub>)를 생성한다는 사실을 확인하였다. Nitric oxide (NO)는 nitric oxide

synthase (NOS) 에 의해 아미노산 L-arginine 으로 부터 생성이 되며 NO 를 생성하는 효소 (NOS: nitric oxide synthase)는 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS(c-NOS)와 특별한 상황에서 유도되는 inducible NOS (i-NOS) 의 두 가지로 크게 분류되며 <sup>49)</sup> c-NOS 는 다시 neural NOS(n-NOS)와 endothelial NOS(e-NOS)로 나누어 진다. 이 중 e-NOS 는  $Ca^{2+}$ 과 calmodulin 의존성이며 혈관 내피세포에서 L-arginine 을 기질로 NO 와 citrulline 을 생성하고 NO 는 인접한 평활근을 이완함으로써 혈관을 확장시킨다. 그러나 e-NOS 는 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 효소에 calmodulin 이 결합될 수 있을 일정 수준 이상이 되어야 활성화되고 NO 의 생성도 짧은 시간 동안 소량에 그친다. 한편 i-NOS 는  $Ca^{2+}$  의존성이 없으며, 평소에도 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO 를 생성한다. i-NOS 는 외부 상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역 방어 기전의 다양한 과정을 매개하는 cytokines 인 interleukin-1 이나 tumor necrosis factor(TNF), 염증원인 내독소(lipopolysaccharide: LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoids 에 의해 그 효소의 유도가 저해된다 <sup>50)</sup>. 특히, i-NOS 는  $Ca^{2+}$  -calmodulin 에 독립적으로 작용하고 NO 를 생성하여 많은 병리학적 자극을 유발한다. NO 는 세포내 cGMP 의 농도를 변화시켜 혈관 이완에 관여하고 혈관의 평활근 세포 증식을 억제하며, 혈관 내피세포의 혈소판 응집을 억제하며, 만성적으로 NO 합성을 억제할 경우에 고혈압과 신장의 손상을 가져온다는 보고가 있다 <sup>51)</sup>. 신기능의 감소에 관여하는 여러 가지 요인들 중 혈액학적 변화가 중요하며, NO 는 신장의 혈액학적 변화와 염증 반응을 조절하는데 중요한 인자이다 <sup>52)</sup>. 신장에서 3 가지 모두 발현 되며 <sup>53)</sup> NOS 의

다른 아형들에 의존한다. i-NOS 에 의하여 다량으로 생성된 NO 가 세포 및 조직의 손상을 유발하는 기전으로 제시된 것은 첫째, superoxide 와의 반응에 의하여 peroxynitrite 를 생산하고 지질의 과산화를 유발함으로써 조직의 손상을 유발할 수 있으며 <sup>54)</sup> 둘째, 미토콘드리아의 세포 호흡이나 DNA 합성에 관여하는 주요 효소의 철 함유 부위 (iron containing moiety)에 결합함으로써 세포에 대한 독성을 유발하고 <sup>55)</sup> 셋째, proinflammatory cytokine 인 TNF 나 IL-1 을 유도하여 염증 반응을 촉진시킬 수 있다는 것 <sup>56)</sup> 등이다. Noiri 등 <sup>57)</sup>도 허혈에 의한 rat 신장에서 antisense oligodeoxynucleotide 에 의해 i-NOS 의 활동을 감소시켜 i-NOS mRNA 를 억제함으로써 신장 세뇨관 손상이 감소를 보여주었으며, i-NOS 가 없는 mice 에서 얻어진 신장 세뇨관은 허혈성 손상에 대한 저항성이 있음을 보여주었다 <sup>58)</sup>. 본 연구에서도 사이클로스포린 단독 투여군에서는 사이클로스포린 반응성 산소종의 발생을 관찰할 수 있었고 사이클로스포린과 L-NAME 병용 투여군과 사이클로스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군에서 반응성 산소종의 발생이 줄고 신장 세포가 회복됨을 관찰할 수 있었다.

근래에 lipid peroxidation 이 신독성의 중요한 인자로 보고되고 있는데, 세포막에서 고농도의 포화 지방산이 함유되어 있으며 세포의 정상 방어기계인 glutathion, superoxide dismutase 와 glutathione peroxidase system 이 적절한 기능을 못할 때 oxygen free radical 이 생성되어 lipid peroxidation 이 초래됨으로써 신손상을 유발하게 된다 <sup>59-62)</sup>. 한편 Wang 등 <sup>34)</sup>은 uninephrectomized rat 에서 사이클로스포린을 복용시켰을 때 신피질 malondialdehyde 가 사이클로스포린의 투여용량을 늘일수록 증

가하고, 사이클로스포린과 lipid scavenger 인 비타민 E 를 동시에 투여하여 malondialdehyde 증가와 사구체 여과율의 감소가 억제되었으며 항산화제인 비타민 E 와 세레늄이 결핍된 쥐에서 사이클로스포린 투여시 malondialdehyde 가 증가하고 신독성이 증가하는 것을 관찰하였다. 본 연구에서도 사이클로스포린 투여 쥐에서 지질 과산화 지표인 malondialdehyde 가 증가함을 관찰하였으며 green tea polyphenol 을 투여하였을 때 의의있게 malondialdehyde 가 감소함을 관찰하였고 항산화 효과를 나타내는 지표들이 모두 회복됨을 알 수 있었다.

최근 항산화 효과를 나타내는 여러 가지 물질들이 신독성의 예방적 치료로 연구되고 있다. 특히 Green tee polyphenol 은 최근 다양한 생화학적 활동과 적은 독성으로 많은 관심을 받고 있다<sup>63-65</sup>. 구성 성분은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate, (-)-gallocatechin 3-O-gallate, (-)-epicatechin 3-O-gallate, (-)-epigallocatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epicatechin 그리고 catechin 등으로 이중에서 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)가 green tea polyphenol 의 주된 성분이며 arginine 에 의해 유발된 신손상을 요독으로부터 회복시켜주는 중요한 성분이다<sup>65,66</sup> (figure 2). EGCG 가 생체에 미치는 영향에 대한 작용기전은 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)에 의하여 유도한 피부세포의 microsome 내에 prostaglandins(PGs)의 증가 차단, orotidine 5-phosphate decarboxylase (ODC) 생산의 억제 혹은 차단하거나 free radical formation 을 억제, protein kinase C 와 cellular proliferation 을 억제한다. EGCG 와 Glutamyl pyruvic transaminase (GPT)는 phase II 효소들인 glutamyl S-transferase (GST), glutathione peroxidase, catalase 등을 증가시키는 한편 tumor promoter 와 호르몬 등이 수용체와

결합하는 것을 차단하는 효과가 있다<sup>67)</sup>.

Mason 등<sup>68)</sup>에 의하면 사이클로스포린의 신독성에 레닌-안지오텐신-알도스테론계의 활성화가 그 기전이라고 주장하였다. 그 근거로 사이클로스포린 투여 후 방사구체장치가 비후되며 수입 소동맥내 레닌 염색이 증가하는 점이며<sup>69)</sup> 이와 함께 간질의 섬유화가 발생하는 것이다. 또 장기간 안지오텐신 II 를 투여한 쥐에서 사이클로스포린 신독성이 있는 사람 및 동물 신조직 및 혈장내 레닌치가 증가되어 있고, 사이클로스포린 신독성시 안지오텐신 전환효소 억제제 또는 안지오텐신 수용체 길항제를 쓰면 간질의 섬유화가 줄어든다는 점<sup>70)</sup>도 레닌-안지오텐신-알도스테론계의 관여를 뒷받침한다. 본 연구에서도 사이클로스포린 투여 군에서 혈중 알도스테론이 유의있게 증가하였고 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 사이클로스포린 투여군에 비하여 혈중 농도가 유의있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

신장 이식 후 고칼륨혈증이 흔히 관찰되는데 Adu 등<sup>71)</sup>은 사이클로스포린이 저알도스테론과 동반된 제 4 형 신세뇨관성 산증 및 중등도의 신장 손상을 일으킨다고 하였고, Bantle 등<sup>72)</sup>은 사이클로스포린이 레닌을 저하시키고 알도스테론에 대한 반응을 저하시킨다고 하였다. Kamel 등<sup>73)</sup>은 알도스테론에 대한 반응이 저하된 이유를 신피질 원위 네프론에서 중탄산염뇨가 없는 상황에서는 적절한 전기화학적 변화도가 발생하지 않고 칼륨 통로의 작용도 떨어지기 때문이라고 설명하였다. 이와 같이 사이클로스포린에 의한 고칼륨혈증을 저레닌 저알도스테론증으로 설명한 이론이 많았으나, 최근에는 사이클로스포린이 집합관 주세포의 기저



측면의 Na-K-ATPase 에 직접적인 저해 작용을 하여 칼륨 분비를 저하시킨다는 이론이 제기되고 있다 <sup>74)</sup>. 그러나 본 연구에서는 혈중 칼륨 농도는 사이클로스포린 투여군에 감소하였으나 유의한 차이는 없었으며, green tea polyphenol 병용 투여 군에서 다시 증가하였으나 정상 대조군과 비교하여 유의있는 차이를 보이지 않았다. 혈중 칼륨 농도에 대해서는 알도스테론 이외의 다른 조절 인자들이 관여했는지에 대한 연구와 사이클로스포린의 투여기간이 21 일로 짧았던 점을 감안하여 장기적인 사이클로스포린 투여 후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

사이클로스포린 급성 독성의 특징적인 형태학적 변화로는 내형질 세망의 부종, 근위 세뇨관 상피 세포질내 공포 형성의 소견 등이 관찰된다 <sup>75)</sup>. 본 연구에서는 광학 현미경상 사이클로스포린 단독 투여군에서 근위세뇨관 부위의 부종과 괴사 소견을 관찰할 수 있었으며 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 사구체와 세뇨관에서 이러한 소견들을 찾아볼 수 없었고 정상 대조군과 유사한 소견을 관찰하였다.

## V. 결론

본 연구에서 green tea polyphenol의 혈중 농도를 보다 안정하게 유지하고 사이클로스포린과 직접적인 약리 작용을 방지하기 위하여 다른 경로로 rats에 투여하였다. 사이클로스포린의 신독성에 대한 신손상의 지표로서 혈청 BUN, creatinine을 측정하였으며 사이클로스포린 단독 투여군에서는 혈청 BUN과 creatinine의 증가하였으며 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 의의있게 감소함을 관찰하였다. 이는 L-NAME를 병용 투여했을 때와 유사한 결과를 보여 NO와 관련이 있음을 알 수 있었다. 사이클로스포린과 Green tea polyphenol을 병용 투여하여 지질 과산화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 신장 조직의 mitochondria를 분리하여 malondialdehyde를 측정하였으며 사이클로스포린 단독 투여군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, green tea polyphenol 병용 투여군에서는 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 의의있게 감소하였고 정상 대조군에 비해서는 유의한 차이는 없었다. Green tea polyphenol의 혈중 알도스테론에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 알도스테론과 칼륨 농도를 같이 측정하였으며 사이클로스포린 단독 투여군에서는 혈청 알도스테론이 정상 대조군에 비하여 의의있게 증가함을 관찰하였으나 혈청 칼륨 농도는 변화를 보이지 않았고, green tea polyphenol 병용 투여군에서는 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 혈청 알도스테론이 의의있게 감소하였으나 정상 대조군에 비하여 유의한 차이는 없었고 혈청 칼륨 농도는 의의 있는 변화를 보이지 않았다.

결론적으로 본 연구에 의하면 사이클로스포린 신독성의 기전이 지질 과산화에 관여하고 NO 생성과 연관이 있으며 알도스테론계이 항진되며, green tea polyphenol 을 병용 투여 하였을 때 산소 유리기를 제거하고 지질 과산화를 차단하며 알도스테론을 억제하는 효과를 통하여 사이클로스포린의 신독성을 임상적으로나 형태학적으로 완화시켜 줄 수 있음을 의미하여, 사이클로스포린을 복용하고 있는 신장 이식 환자에 green tea polyphenol 을 병용투여 함으로써 임상적으로 사이클로스포린 유발성 신독성 예방효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Morris PJ : Cyclosporine A. *Transplantation* 32:349-354, 1981.
2. Morris PJ : Cyclosporine. In : Morris PJ. Ed, *Kidney Transplantation* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company pp 179-201, 1994.
3. Myers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, Leutscher JA, Whitney DJ, Krasny D, Coplson NS, et al, L the longtern course of cyclosporine-assoicated chronic nephropathy, *Kidney Int* 33(2):590-600, 1988.
4. Kumano K, Yoshida K, Iwamura M, Endo T, Sakai T, Nakamura K, Kuwao T : The role for reactive oxygen species in cyclosporine A induced nephrotoxicity in rats. *Transplant Proc* 21(1 Pt1):941-942, 1989.
5. Durak I, Karabacak HI, Buyukkocak S, Cimen MY, Kacmaz M, Omeroglu E, et al. Impaired antioxidant defense system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. Protective effects of vitamins E and C. *Nephron* 1998;78(2):207-11.
6. Parra T, de Arriba G, Conejo JR, Cantero M, Arribas I, Rodriguez-Puyol D, et al. Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1998;66(10):1325-9.
7. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999;31(4):971-97.
8. Moncada, S., Palmer, RMJ., Higgs, EA., "Nitric oxide, physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Review*. 1991, 43, 109-142.

9. Bult, H., Boeckxstaens, GE., Pelckmans, PA., Jordaens FH., van Maercke YM., Herman, AG., "Nitric oxide as inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." *Nature*. 1990, 345, 346-347.
10. Radomski, MW., Palmer, RM., Moncada, S., "An L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation." *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87, 5193-5197.
11. Hibbs, JB., Tainter, RR., Vavrin, Z., Rachlin, EM., "Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule" *Biochem Biophys Res Commun*. 1988, 157, 87-94.
12. Ito, S., Ren, YL., "Evidence for the role of nitric oxide in the macula densa control of glomerular hemodynamics" *J Clin Invest*. 1993, 92, 1093-1098.
13. Radermacher, J., Klanke, B., Schurek, HJ., Stotte, HF., Frohlich, JC., "Importance of NO/EDRF for glomerular and tubular function: studies in the perfused rat kidney." *Kidney Int*. 1992, 41,1549-1559.
14. Shultz, PJ., Tolins, JP., "Adaptation to increased dietary salt intake in the rat: Role of endogenous nitric oxide" *J Clin invest*. 1993, 91, 642-650.
15. Shultz, PJ., Schorer, AE., Raij, L., "Effects of endothelium-derived relaxing factor on rat mesangial cells" *Am J physiol*. 1990, 258, F162-167.
16. Raij, L., Shultz, PJ., "Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: Effects on and production of mesangial cell and glomerulus" *J Am Soc Nephro*. 1993, 3:1435-1441.
17. Hruby, Z., Beck, KF., "Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells." *Clin Exp Immunol*. 1997, 107, 76-82.

18. Knight JA, Cheung AK, Pieper RK, Servilla K. Increased urinary lipoperoxide levels in renal transplant patients. *Ann Clin Lab Sci* 1989; 19(4):238–41.
19. Graham, HN. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev Med*, 1992, 21, 334-350.
20. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52:7673-751.
21. Shihab FS. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 1996;16:536-547.
22. Campistol JM, Sacks SH. Mechanism of nephrotoxicity. *Transplantation* 2000;69(12 Suppl):S5-S10.
23. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T L Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis, *Kidney Int* 39:550-556, 1991.
24. El Nahas AM : Pathways to renal fibrosis, *Exp Nephrol* 3:71-75, 1995.
25. No W, Brecklin C, Garber SL, Song RH, Pegoraro AA, Au J Arruda JAK, Dunea G, Sing AK : Changes in collagenases and TGF- $\beta$  precedes structural alterations in a model of chronic fibrosis, *Kidney Int* 56:145-153, 1999.
26. Meyer-Lehnert H, Schrier RW: Cyclosporine A enhances vasopressin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and contraction in mesangial cells. *Kidney Int* 34(1):89-97, 1988
27. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S, Hanson P, Nohanty PK, Victor RG: Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J med* 323(11):693-699, 1990

28. Troung LD, Farhood A, Tasby J, Gillum D : Experimental chronic ischemia : Morphology and immunologic studies. *Kidney Int* 41:1676-1689, 1992.
29. Nast CC, Adler SG, Artishevsky A, Kresser CT, Ahmed K, Anderson PS : Cyclosporine induces elevated procollagen(I) mRNA levels in the rat renal cortex. *Kidney Int* 39:631-638, 1991.
30. Benigni A, Bruzzi, Mister M, Azzolini N, Gaspari F, Perico N, Gotti E, Bertani T, Remuzzi G: Nature and mediators of renal lesions in the kidney transplant patients given cyclosporine for more than one year. *Kidney Int* 55:674-685, 1999.
31. Strom EH, Epper R, Mihatsch MJ: Cyclosporine associated arteriopathy : the renin producing vascular smooth muscle cells are more sensitive vascular smooth muscle cells are more sensitive to cyclosporine toxicity. *Clin Nephrol* 43:226-231, 1995.
32. Palestine AG, Austine HA, Balow JE, Antony7 표초 TT, Sabins SG Preuss HG, Nussenblatt RB : Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N Engl J Med* 314:12193-1298 1986.
33. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J : Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902, 1992.
34. Wang C, Salahudeen AK : lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity : effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934, 1995.
35. Shah SW : The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Ann Rev Physiol* 57:245-262, 1995.
36. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T : Requirement for generation of

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299, 1995.
37. Sen CK, Packer L : Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996 ;10(7):709-20.
  38. Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME : Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int.* 1998 Feb;53(2):367-81.
  39. Sies H : Oxidative stress. Oxidant and Antioxidant, p650, Academic Press, London, 1991.
  40. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ : Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997 Mar 14;275(5306):1649-52.
  41. Faud S, Shiha B, Hong YI, William MB, Takeshi FA: Effect of nitric oxide modulation on TGF- $\beta$  1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephropathy *Kidney Int.* 2000,1174-1185.
  42. Islam M, Burke JF Jr, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, Kanalas J, Sharma: Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 2001 Feb;59(2):498-506.
  43. Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF : Differential activation of a calcium-dependent endonuclease in human B lymphocytes. Role in ionomycin-induced apoptosis. *J Immunol.* 1995 Oct 1;155(7):3297-307.
  44. Owens MW, Milligan SA, Jourdeuil D, Grisham MB : Effects of reactive



metabolites of oxygen and nitrogen on gelatinase A activity. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):L445-50.

45. Waiser J, Dell K, Bohler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH: Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Sep;17(9):1568-77.
46. 채현기, 이수진, 김현주, 공구, 강경원, 강종명: 사람의 혈관간 세포에서 cyclosporine 이 반응성 산소종과 세포외 기질 축적에 미치는 영향, 대한신장학회 2000, 19(6)1024-1032.
47. Forchgott, RF., Zawadki, JV.:The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288, 373.
48. Stuehr DJ, Marletta, MA.:Inhibition of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophage by BCG infection, lymphokines or interferon gamma. *J Immunol* 1987, 139, 518.
49. Ignaro, LJ., Buga, GM., Wood, KS., Byrns, RE., Chaudhuri, G., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1987, 84, 9265.
50. Knowles, RJ., Salter, M., Brooks, SL., Moncada, S.,:Biochem Biophys Res Commun, 1990, 172, 1042.
51. Baylis, C., Mitruka, B., Deng, A.,: Chronic blockade nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin invest*, 1992, 90, 278-281.
52. Simns, LA: Interrelations of lipid and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 contries. *Am J Cardiol.* 1986, 57, 5G-10G.

53. Ketteler M, Border WA, Noble NA: Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol*, 1994; 267, F197-F207.
54. Xia, Y., Dawson, VL., Dawson, TM., Snyder, SH., Zweier, JL: Nitric oxide synthetase generate superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93, 677-6774.
55. Nussler, AK., Basillar TR., "Inflammation and immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase" *J Leukoc Biol*. 1993, 54, 171-178.
56. Lander, HM., Sehajpal, P., Levine, DM., Novogrodsky, A., "Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds" *J Immunol*. 1993, 150, 1509-1516.
57. Noiri, E., Pereslini, T., Miller, F., Goligorsky, M.S., "In-vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia." *J Clin Invest*. 1996, 97, 2377-2383.
58. Ling, H., Edelstein, C., Gengaro, P., "Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice." *Am J Physiol*. 1999, 277, F383-F390.
59. Trifillis AL, Kahng MW : Effect of cyclosporine A on cultured human kidney cells: lipid peroxidation and cytosolic calcium. *Transplant Proc*. 1988 Jun; 20(3 Suppl 3): 717-21.
60. Misra HP, Fridovich I : The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25; 247(10): 3170-5.

61. 신연성, 김영욱, 김용진, 박용훈 : 실험쥐에서 cyclosporine A 신독성 경감을 위한 vitamine E 동시 투여 효과. 대한이식학회지 11-20, 1997.
62. Trachtman, H., Futterweit, S., Garg, P., "Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 218, 704-708.
63. Hung CF, Huang TF, Chiang HS, Wu WB: (-)-Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenolic compound from green tea, inhibits fibroblast adhesion and migration through multiple mechanisms. *J Cell Biochem.* 2005 Sep 1;96(1):183-97.
64. Yokozawa T, Oura H, Hattori M, Iwano M, Dohi K, Sakanaka S, Kim M: Inhibitory effect of tannin in green tea on the proliferation of mesangial cells. *Nephron.* 1993;65(4):596-600.
65. Kim HC, Chang EJ, Mun KC: Effects of epigallocatechin gallate on the hemolysis induced by cyclosporine. *Transplant Proc.* 2005 Jun;37(5):2385-6.
66. Nakagawa T, Yokozawa T, Sano M, Takeuchi S, Kim M, Minamoto S: Activity of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate against oxidative stress in rats with adenine-induced renal failure *J Agric Food Chem.* 2004 Apr 7;52(7):2103-7.
67. Morrissey, JJ., Kshidoys, S., McCracken, R., Klahr, S., "Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy." *J Am Soc Nephrol.* 1996, 7, 2202-2212.
68. Mason J, Muller-Schweinitzer E, Dupont M, Casellas D, Mihatsch M, Moore L, Kaskel F : Cyclosporine and the renin-angiotensin system. *Kidney Int Suppl.* 1991 Jun;32:S28-32.

69. 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 Dec;11(12):2265-71.
  70. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, Lindsley J, Bennett WM : Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol.* 1995 Oct;269(4 Pt 2):F491-9.
  71. Adu D, Turney J, Michael J, McMaster P : Hyperkalaemia in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Lancet.* 1983 Aug 13;2(8346):370-2.
  72. Bantle JP, Nath KA, Sutherland DE, Najarian JS, Ferris TF : Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. *Arch Intern Med.* 1985 Mar;145(3):505-8.
  73. Kamel KS, Ethier JH, Quaggin S, Levin A, Albert S, Carlisle EJ, Halperin ML : Studies to determine the basis for hyperkalemia in recipients of a renal transplant who are treated with cyclosporine. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Feb;2(8):1279-84.
  74. DuBose TD Jr : Hyperkalemic hyperchloremic metabolic acidosis: pathophysiologic insights. *Kidney Int.* 1997 Feb;51(2):591-602.
- Whiting PH, Thomson AW, Blair JT, Simpson JG : Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br J Exp Pathol.* 1982 Feb;63(1):88-94