



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  
년  
2  
월

2006년 2월  
博士學位論文

博  
士  
學  
位  
論  
文

사  
이  
클  
로  
스  
포  
린  
유  
발  
성  
신  
손  
상  
에  
대  
한  
녹  
차  
폴  
리  
페  
놀  
의  
항  
단  
백  
뇨  
효  
과

박  
경  
희

흰쥐에서 사이클로스포린 유발성

급성 신장 손상에 대한

green tea polyphenol의 항단백뇨 효과

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

朴 景 姬

흰쥐에서 사이클로스포린 유발성

급성 신장 손상에 대한

green tea polyphenol의 항단백뇨 효과

**The Antiproteinuric Effects of Green Tea Polyphenol  
on Cyclosporine-A Induced Acute Renal Injury in Mice**

2006년 2월 일

朝鮮大學校 大學院

醫學科

朴景姬

흰쥐에서 사이클로스포린 유발성  
급성 신장 손상에 대한  
green tea polyphenol의 항단백뇨 효과

指導教授 鄭 春 海

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 11월 일

朝鮮大學校大學院

醫學科

朴景姬

# 박경희의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	홍 순 표	인
위원	조선대학교 교수	정 춘 해	인
위원	조선대학교 교수	정 종 훈	인
위원	조선대학교 교수	김 현 리	인
위원	서남대학교 교수	신 병 철	인

2005년 12월 일

朝鮮大學校 大學院

## 목 차

도표 목록 . . . . .	ii
ABSTRACT . . . . .	iii
서론 . . . . .	1
재료 및 방법 . . . . .	5
결과 . . . . .	8
고찰 . . . . .	17
결론 . . . . .	25
참고문헌 . . . . .	27

## 도표 목록

### 표 및 그림 목차

Table 1. The effects of green tea polyphenol on serum creatinine and blood urea nitrogen in CsA-treated mice-----	11
Table 2. The effects of green tea polyphenol on serum CsA level in CsA-treated mice -----	12
Table 3. The antioxidant effects of green tea polyphenol in CsA-treated mice -----	13
Figure 1. The effects of green tea polyphenol on urine protein amount in CsA-treated mice -----	14
Figure 2. The effects of green tea polyphenol on CsA-induced lipid peroxidation in kidneys of mice -----	15
Figure 3. Light microscopic findings of mice kidney (PAS staining) -----	16

## ABSTRACT

### **The Antiproteinuric Effects of Green Tea Polyphenol on Cyclosporine A- Induced Acute Renal Injury in Mice**

Park, Kyung Hee

Adviser; Chung, Chun-Hae M.D., PhD

Department of Internal Medicine,

Graduate School of Chosun University

#### *Purpose*

It has been reported that there is association between cyclosporine(CsA) nephrotoxicity and proteinuria. Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), has potent antioxidants. The aims of this study were to investigate the anti-proteinuric effects of green tea polyphenol on CsA-induced acute renal injury in mice.

#### *Method*

The mice (n=20) were divided into 4 groups (n=5/group); group 1 (control group) mice were intraperitoneal (IP) injected 0.9% saline 3 times at 4 day intervals, group 2 (CsA group) mice were IP injected CsA 50 mg/kg 3 times at 4 day intervals, group 3 (iNOS group) mice were received in addition L-NAME 12 mmol/L by subcutaneous injection 3 times at 4 day intervals. Group 4 (polyphenol group) mice were received CsA by IP injection and green tea polyphenol 100mg/Kg by subcutaneous injection 3 times at 4 day



intervals. The urine samples were collected to measure urine protein and creatinine. At last day, upon sacrifice of the mice, blood sampling for measurement of blood CsA level, blood urea nitrogen (BUN), creatinine and nephrectomy for morphological study, malondialdehyde and antioxidative enzyme analysis.

### ***Results***

The levels of BUN ( $20.2 \pm 5.2$  mg/dL vs  $18.9 \pm 6.4$  mg/dL,  $p > 0.05$ ), serum creatinine ( $0.45 \pm 0.33$  mg/dL vs  $0.39 \pm 0.29$  mg/dL,  $p < 0.01$ ) and serum CsA level ( $5,432 \pm 1,089$  ng/mL vs  $5,765 \pm 1,320$  ng/mL,  $p > 0.05$ ) of CsA group (group 2, only CsA) and polyphenol group (group 4, green tea polyphenol with CsA) were not significantly increased compared to control group (group 1). In the urine protein, there were significantly increased in group 2 ( $28.6 \pm 11.1$  g/kg/day vs  $9.1 \pm 5.5$  g/kg/day) compared to group 1 and significantly decreased in group 4 ( $12.1 \pm 8.8$  g/kg/day) compared to group 2 but there were no significant increase in comparison group 4 with group 1. Renal tissue malondialdehyde level of group 2 was significantly increased compared to group 1 but, there were no significant increase in comparison group 4 with group 1. In the histologic examination, there are proximal tubular necrosis and mild interstitial inflammation in the kidney of mice after CsA injection group but no significant pathologic change in green tea polyphenol and L-NAME injected group.

### ***Conclusion***

This study provides that proteinuria is an early sign of the CsA-induced nephrotoxicity and is associated with lipid peroxidation and nitric oxide production. Green tea polyphenol

treatment has significantly antiproteinuric effects by antioxidative effect in the kidney from CsA-induced acute renal injury.

**Key words**

Green tea polyphenol, cyclosporine, proteinuria, antioxidant

## I. 서론

사이클로스포린은 fungi imperfecti 인 *Tolypocladium inflatum* 에서 추출된 11개의 아미노산으로 구성된 분자량 1202의 환상 펩타이드이다<sup>1)</sup>. 사이클로스포린은 Borel 에 의해 강력한 면역억제 효과가 있음이 밝혀졌으며 T 세포에 선택적으로 작용하므로<sup>2,3)</sup> 골수 독성이 없는 약제로서 임상 의사들의 관심을 끌게 되었다. 사이클로스포린이 임상에 처음 적용된 것은 1978년 Calne<sup>4)</sup>과 Powels<sup>5)</sup> 등에 의한 신장 및 골수 이식으로서 좋은 결과가 발표되면서 이후 점차 그 적용 범위가 확대되어 현재는 장기 이식 이외에도 자가면역 질환<sup>6)</sup> 및 기존의 치료에 반응하지 않는 신증후군 치료에도 사용되고 있다<sup>7,8)</sup>.

사이클로스포린 사용으로 가장 문제가 되고 있는 점은 신독성이 있다는 것으로 사이클로스포린의 사용에 중요한 제한 요인이 되고 있다. 사이클로스포린의 급성 신독성을 일으키는 기전은 여러 가지로 알려져 있는데, 주로 신장내 미세혈관의 수축으로 신혈관 저항이 증가되어 이에 따른 혈류량 감소와 사구체 여과율 감소로 나타나지만 아직 정확한 혈관 수축의 기전은 밝혀지지 않고 있다. 최근 사이클로스포린 신독성에 신장 조직의 지질 과산화(lipid peroxidation)가 관여된다고 보고되고 있으며<sup>9,10)</sup>, Wang 등<sup>9)</sup>은 사이클로스포린이 주로 미토콘드리아 cytochrome P-450에서 대사 되고 이 cytochrome P-450이 활성화되는 동안 과도하게 반응성 산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되어 지질 과산화에 의해 사이클로스포린 신독성을 일으킨다고 주장하였다.

신장 내에서 NO 는 사구체 혈관 평활근의 긴장도를 이완시키고 <sup>11)</sup>, 세뇨관에서의 sodium 재흡수를 억제하며 <sup>12,13)</sup>, 메산지움 세포의 수축 및 증식을 억제하는 기능을 가지고있다 <sup>14,15)</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 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다 <sup>16)</sup>. 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 분류된다 <sup>17)</sup>. 그리고, 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. 그런데, e-NOS 는 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 효소에 calmodulin 이 결합될 수 있을 일정 수준 이상이 되어야 활성화되고 NO 의 생성도 짧은 시간동안 소량에 그친다. 한편 i-NOS 는  $Ca^{2+}$  의존성이 없으며, 평소에도 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO 를 생성한다. 이와 같은 i-NOS 는 외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 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 저해되는 것으로 알려져 있다 <sup>18)</sup>.

Mayer-Lehnert 와 Schrier<sup>19)</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>20)</sup>은 사이클로스포린이 교감신경 활성도를 증가시키고 시냅스 전후의 혈관 반응을 증가시켜 혈관 수축이 일어난다고 하지만 혈중에 카테콜라민의 증가가 증명되지 않았다

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. 따라서 사이클로스포린을 투여하는 환자에서는 정기적으로 사이클로스포린의 농도와 신기능을 검사하게 된다. 그러나 조직학적 독성은 임상 독성이 나타나지 않는 예에서도 출현할 수 있으며 임상 소견으로 조직 변화를 예측할 수 없는 경우도 흔히 있다. 만성적인 조직학적 변화는 비가역적이라고 추정되므로 사이클로스포린을 장기 투여하는 환자에서는 조직 검사가 독성 진단에 필수적일 뿐 아니라 비가역적인 조직 손상 정도를 판단하는데 도움이 된다.

녹차 성분 중 하나인 Polyphenol 은 flavanols, flavandiols, flavonoids 그리고 phenolic acids 등을 포함한다<sup>21)</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 알려져 있었으나 그 정확한 기전은 아직까지 밝혀져 있지

않고 있다.

본 연구에서는 사이클로스포린의 사용에 의한 신독성으로 혈청 크레아티닌치의 상승, 사구체 여과율의 감소 및 고혈압 등의 임상 소견이 나타나기 전에 단백뇨가 먼저 관찰되는 경우를 임상에서 흔히 관찰하므로, 실험 동물을 대상으로 사이클로스포린에 의한 급성 신장 손상을 유발시켜 혈중 크레아티닌과 사구체여과율이 정상인 상태에서 단백뇨가 나오는 것을 관찰하고 이에 관련된 기전을 알아보기 위하여 신장 조직에서 지질 과산화의 지표인 malondialdehyde 를 측정하고 항산화 효소의 지표들을 검사하였다.

또한 항산화제로 알려진 green tea polyphenol 과 사이클로스포린을 병용 투여하여 사이클로스포린 신독성 기전으로써 지질 과산화의 관여 여부와 항산화 효소 활성도를 관찰하고 신장 조직의 형태학적 검사를 실시하여 green tea polyphenol 의 사이클로스포린 신독성에 의한 항단백뇨 효과가 있는지를 알아보고자 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. 이 중 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%)이다.

### B. 실험용 mice 준비와 처치

실험용 mice 는 다물사이언스 (Damoool Science, Daejeon, Korea)에서 주문 받았으며 숫컷 20 마리로 몸무게는 20-25g 이었다. 실험군은 4 군으로 분류하였는데 1 군은 대조군(Control, n=5)으로 생리식염수를 복강에 투여하였고, 2 군은 사이클로스포린 단독 투여군 (n=5)으로 사이클로스포린 50 mg/kg 을 복강내 3 차례 4 일 간격으로 투여하였으며, 3 군은 iNOS inhibitor 병합 투여군(n=5)으로 사이클로스포린 50 mg/kg 과 같이 iNOS inhibitor (L-NAME, N-nitro-L-arginine-methylester, Sigma)을 12mmol/L 을 피하로 3 회에 걸쳐 투여하였다. 4 군은 green tea polyphenol 병합 투여군(n=5)으로 사이클로스포린 50 mg/kg 을 복강으로 투여한 후 green tea polyphenol 은 100mg/Kg 을 3 회에 걸쳐 4 일 간격으로 등을 이용한 피하주사를 통해 투여하였다. Green tea polyphenol 을 피하 주사한 이유는 혈중 농도를 보다 안정하게 유지하고

사이클로스포린과의 직접적인 약리 작용을 방지하기 위해서였다.

실험 마지막 날에 소변을 채취하여 소변에서 단백질과 크레아티닌을 측정하였으며 mice 를 개복하여 하부 복부 대동맥을 통하여 실험에 필요한 채혈을 하고, 신장을 적출하였다. 조직의 채취를 위한 조작은 ice jar 에서 실시하여 조직의 손상을 최소화하였으며 -70℃ 상태로 냉동시켜 보관하였으며 이들의 검사는 정한 같은 날에 실시하였다.

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. 총 glutathione(GSH)은 Ellman 방법을 이용하였다. 신조직의 homogenate 에서 Catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)을 각각 측정하였다.

### **C. 병리조직학적 검사**

형태학적인 변화는 광학현미경 검사를 실시하였다. 표본은 절반씩 분할하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 다음 파라핀 블록을 제작하고 신장 조직은 3-4  $\mu\text{m}$  의 박편을 만들어 hematoxylin & eosin(H&E) 및 periodic acid-Schiff (PAS) 염색



을 실시하고  $\times 100$  와  $\times 400$  현미경 시야에서 관찰하였다.

#### **D. 통계분석**

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

### III. 결과

#### 1. 혈청 BUN 과 크레아티닌 값

신기능 검사 지표로서 혈청 BUN 과 크레아티닌을 측정하였다 (ADVIA 1650, Bayer, USA). 대조군에서 혈청 BUN 은  $(19.1 \pm 5.6 \text{ mg/dL})$ 이고 혈청 creatinine 은  $(0.38 \pm 0.25 \text{ mg/dL})$ 이었다. 혈청 BUN 과 크레아티닌 값은 모든 군에서 통계학적으로 유의있는 변화를 보이지 않았다. (Table 1)

#### 2. 혈청 사이클로스포린 농도 검사

사이클로스포린 투여군에서 혈청 사이클로스포린 농도를 측정하였다. 사이클로스포린 단독 투여군에서 혈청 사이클로스포린 농도는  $(5,432 \pm 1,089 \text{ ng/dL})$  이었다. iNOS inhibitor 병용 투여군( $5,621 \pm 1,289 \text{ ng/dL}$ )과 green tea polyphenol 병용 투여군 ( $5,765 \pm 1,320 \text{ ng/dL}$ )에서도 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 통계학적으로 유의있는 변화는 없었다. (Table 2)

#### 3. 소변에서 단백질 정량 검사

모든 실험군에서 소변 단백질 정량 검사를 실시하였다 (Cobas Integra 800, Roche, Swiss). 단백질 양은 정상 대조군에서는  $(9.1 \pm 5.5 \text{ g/kg/day})$ 였으며, 사이클로스포린 단독 투여군에서는 대조군에 비하여 유의있게 상승하였으며  $(28.6 \pm 11.1 \text{ g/kg/day})$ , iNOS inhibitor 병용 투여군( $18.5 \pm 9.4 \text{ g/kg/day}$ )에서와 green tea polyphenol 병용 투여

군( $12.1 \pm 8.8$  g/kg/day)에서 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의있게 감소하였고, 특히 green tea polyphenol 병용 투여군에서 정상 대조군에 비해 유의한 증가 소견이 없을 정도로 회복되었다. (Figure 1)

#### 4. 신장 조직의 malondialdehyde

지질 과산화 지표로서 malondialdehyde 를 측정하였다. 혈청 malondialdehyde 농도는 정상 대조군에서는 ( $0.80 \pm 0.21$  nmol/mg protein)였으며, 사이클로스포린 단독 투여군에서는 대조군에 비하여 유의있게 상승하였으며 ( $2.53 \pm 0.94$  nmol/mg protein), iNOS inhibitor 병용 투여군( $1.12 \pm 0.34$  nmol/mg protein)에서와 green tea polyphenol 병용 투여군( $0.99 \pm 0.32$  nmol/mg protein)에서 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의있게 감소하였고 정상 대조군에 비해 유의한 증가 소견은 없었다. (Figure 2)

#### 5. 항산화 효소 활성도 분석

항산화 효과 대한 지표로서 glutathione(GSH), Catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)을 각각 측정하였다. GSH 는 사이클로스포린 단독 투여군에서 대조군에 비하여 유의있게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), green tea polyphenol 병용 투여군에서 사이클로스포린 단독 투여군에 비하여 유의있게 회복되었다( $p < 0.05$ ). 그러나, 정상 대조군에 비해서 완전하지는 않지만 더 낮은 수치를 보였다. 사이클로스포린 단독 투여군에서

catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST) 활성도가 정상 대조군에 비하여 유의있게 낮았으며( $p < 0.05$ ), 이러한 효소 억제 기능은 green tea polyphenol 병용 투여군에서 유의있게 예방됨을 관찰하였다. (Table 3)

## 6. 신장 병리조직검사 결과

사이클로스포린 단독 투여군에서는 근위 세뇨관들이 위축되었으며 이들 주변으로 섬유화와 염증 세포들이 침윤되어 있었다. 그러나 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 이러한 소견들을 찾아 볼 수 없었으며 정상 대조군과 유사한 소견을 보였다. (Figure 3)

**Table 1. The effect of green tea polyphenol on serum creatinine and blood urea nitrogen in CsA-treated mice.**

	<b>Serum BUN (mg/dL)</b>	<b>Serum Creatinine (mg/dL)</b>
<b>Group 1 (Control)</b>	<b>19.1 ± 5.6</b>	<b>0.38 ± 0.25</b>
<b>Group 2 (CsA)</b>	<b>20.2 ± 5.2</b>	<b>0.45 ± 0.33</b>
<b>Group 3 (CsA + iNOS I)</b>	<b>20.3 ± 5.8</b>	<b>0.41 ± 0.18</b>
<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>	<b>18.9 ± 6.4</b>	<b>0.39 ± 0.29</b>

*CsA : Cyclosporine-A, iNOS I : inducible nitric oxide synthase inhibitor, BUN : blood urea nitrogen.*

**Table 2. The effects of green tea polyphenol on serum CsA level in CsA-treated mice.**

	<b>Serum cyclosporine (ng/dL)</b>
<b>Group 1 (Control)</b>	<b>NS</b>
<b>Group 2 (CsA)</b>	<b>5432 ± 1089</b>
<b>Group 3 (CsA + iNOS I)</b>	<b>5621 ± 1289</b>
<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>	<b>5765 ± 1320</b>

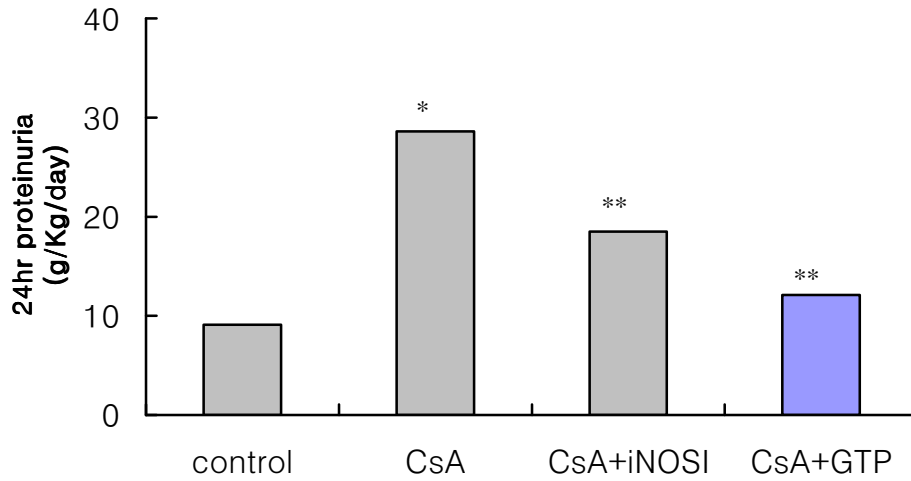
*CsA : Cyclosporine-A, iNOS I : inducible nitric oxide synthase inhibitor*

**Table 3. The antioxidant effects of green tea polyphenol in CsA-treated mice.**

<b>Parameter</b>	<b>Group 1 (Control)</b>	<b>Group 2 (CsA)</b>	<b>Group 3 (CsA + iNOS I)</b>	<b>Group 4 (CsA + green tea polyphenol)</b>
<b>GSH</b>	240 ± 8.0	60 ± 5.2*	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**

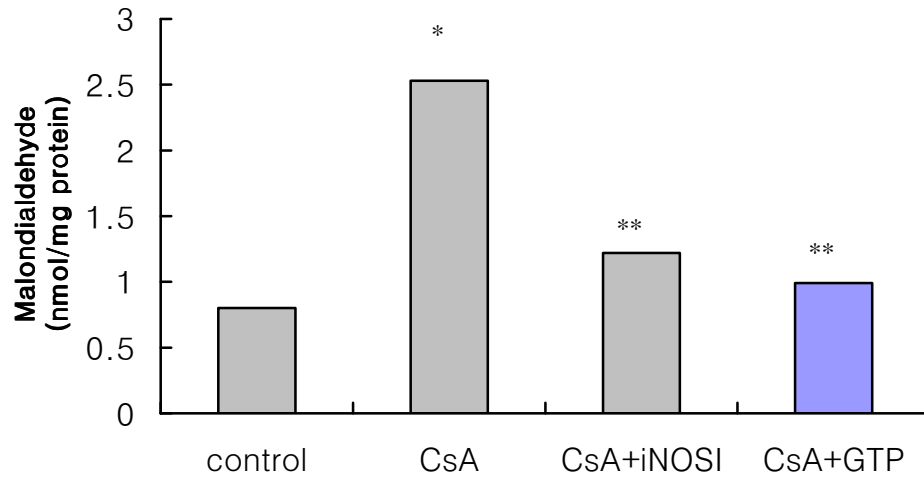
*CsA : Cyclosporine-A, iNOS I : inducible nitric oxide synthase inhibitor*

*GSH : glutathione, SOD : superoxide dismutase, GPx : glutathione peroxidase, GR : glutathione reductase, GST : glutathione-S-transferase. \*p<0.05 compared CsA group with control group; \*\*p<0.05 compared iNOS inhibitor and green tea polyphenol group with cyclosporine group*

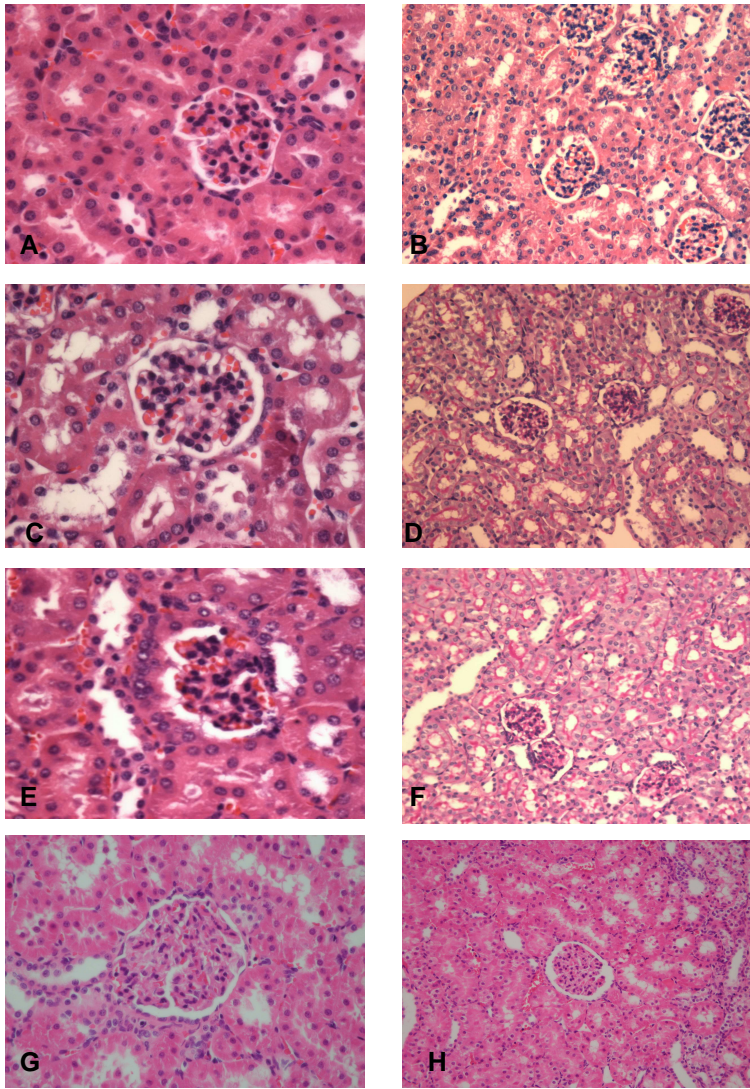


**Figure 1. The effects of green tea polyphenol on urine protein amount in CsA-treated mice.** The 24hr proteinuria level were increased in kidney with cyclosporine-A group but significantly decreased in iNOS inhibitor and green tea polyphenol group. \*  $p < 0.01$  compared CsA group with control group; \*\* $p < 0.01$  compared iNOS inhibitor and green tea polyphenol group with cyclosporine group.





**Figure 2. The effects of green tea polyphenol on CsA-treated lipid peroxidation in mice kidney.** The malondialdehyde level were increased in kidney with cyclosporine-A group but significantly decreased in iNOS inhibitor and green tea polyphenol group. \* $p < 0.01$  compared cyclosporine group with control group; \*\* $p < 0.01$  compared iNOS inhibitor and green tea polyphenol group with cyclosporine group.



**Figure 3. Light microscopic findings of mice kidney (PAS staining).** (A,B) 0.9% saline injected control group. (C,D) CsA injected group. (E,F) CsA and L-NAME (iNOS inhibitor) injected group. (G,H) CsA and green tea polyphenol injected group. Microscopic magnification (A,C,E,G) 40 $\times$ , (B,D,F,H) 100 $\times$ . There are proximal tubular necrosis and mild interstitial inflammation in the kidney of mice after CsA injection (C,D) but no significant pathologic change by green tea polyphenol injection(E,F) and L-NAME injected group(G,H).

## IV. 고찰

본 연구는 흰쥐에 사이클로스포린을 투여하여 급성 신장 손상을 유발하고 단백뇨를 발생시켰으며 이에 대해 green tea polyphenol 의 병합 투여가 항단백뇨 효과를 나타내는지에 알아보고자 하였다. 신장 손상의 정도를 알아보기 위해 흰쥐 혈액에서 BUN, 크레아티닌을 측정하였으며, 혈청 사이클로스포린 농도를 측정하여 사이클로스포린 농도에 변화를 주는지 여부를 관찰하였다. 신장에서 지질 과산화 손상 지표로 malondialdehyde 를 측정하였으며, 항산화 효과를 파악하기 위해 항산화 효소의 활성도를 측정하였다. 또한 흰쥐 신장의 조직학적 검사를 실시하여 형태학적으로도 급성 세뇨관 괴사 및 염증 소견이 호전됨을 관찰하였다.

사이클로스포린은 1980 년대 처음 소개되면서 장기이식, 특히 신장 이식의 1 년 생존율을 획기적으로 올린 약제로 스테로이드와 함께 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 면역억제제이다 <sup>22)</sup>. 사이클로스포린은 11 개의 아미노산으로 이루어진 분자량이 1203 인 면역억제제로서 <sup>23)</sup> 작용기전은 T 림프구의 세포질내에 존재하는 cyclophilin 과 결합한 후 phosphatase 의 한가지인 calcineurin 의 기능을 억제함으로써, nuclear factor of activating T cell(NFAT)이 세포질내에서 핵안으로 이동하여 IL-2 유전자를 활성화 시킬 수 없도록 함으로써 면역억제제의 기능을 나타낸다.

강력한 면역억제제으로써 장기 이식의 성공률을 획기적으로 높인 사이클로스포린은 사이클로스포린의 신독성 때문에 환자 치료를 위하여 사용하는데 중요한 제한

요인이 된다. 정상 신장에서는 세포외 기질(extracellular matrix)의 합성과 분해가 역동적인 평형 상태에 있어 일정한 상태를 유지하지만, 신장의 섬유화는 과도하게 세포외 기질이 많이 생성되거나<sup>24, 25)</sup>, 혹은 생성된 기질이 효과적으로 분해가 되지 않아<sup>26)</sup> 세포외 기질이 축적됨으로써 섬유화가 발생한다.

Truong 등<sup>27)</sup>은 사이클로스포린을 투여하면 신장에서 혈류 역동학적인 변화가 생겨 이로 인한 신장의 혈류 감소가 신장 섬유화의 기전이라고 하였으나, Nast 등<sup>28)</sup>과 Benigni 등<sup>29)</sup>은 신장의 혈류 변화 없이 사이클로스포린이 직접적인 섬유화 작용을 일으킨다고 보고하였다. Benigni 등<sup>29)</sup>은 사이클로스포린을 투여한 후 축적된 세포에서 분비되는 물질이나 성장 인자가 섬유화에 관련이 있을 것이라고 하였다.

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>30)</sup> 세동맥병증이 심화고 괴사가 심할수록 레닌 양성 세포가 감소한다. 혈관 병변의 발생은 사이클로스포린 trough 치 및 용량과 관계가 있다. Palestine 등<sup>31)</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>32, 33)</sup>. 인체의 대사 과정에서 발생하는 이 반응성 산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 여러 가지로 다양한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

즉 고농도에서는 세포에 직접적인 독성을 나타내지만<sup>34)</sup>, 낮은 농도에서는 세포 신호 전달 분자로 작용하거나 유전자의 전사 인자에 영향을 미치며<sup>35, 36)</sup>, 효소의 활성화에도 영향을 미치고<sup>37)</sup>, 세포의 증식을 촉진<sup>38)</sup>, 또는 apoptosis 를 유도하는 등<sup>39, 40)</sup> 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 반응성 산소종과 섬유화의 관계를 보면 반응성 산소종을 배양 중인 혈관간세포에 투여하면 collagen III, IV 와 TGF- $\beta$  의 mRNA 발현을 증가시키고<sup>37)</sup>, 반응성 산소종의 대사물인 페록시아질산염 (peroxynitrite)은 섬유모세포에서 MMP(matrix metalloproteinase)의 해독 후 활성화도 (post-translational activity)를 억제하는 것으로 알려지고 있다<sup>41)</sup>. 본 연구에서도 사이클로스포린 투여군에서 단백뇨가 증가하였으며 iNOS 억제제 병합 투여 군에서 단백뇨 양이 통계학적으로 유의있게 감소하는 것을 관찰하였으며 이는 사이클로스포린 급성 신손상에 의한 단백뇨 증가에도 반응성 산소종인 NO 가 관련되어 있다는 것을 수 있었다. NO scavenger 로 알려진 green tea polyphenol 을 병용 투여했을 때 증가하였던 단백뇨가 거의 정상군에 가깝게 감소하는 것은 이런 사실을 더욱 뒷받침해 주었으며 iNOS 억제제 보다 더 의미있게 단백뇨가 감소하는 것으로 보아 green tea polyphenol 은 NO scavenger 이외에도 다른 효과가 있음을 알 수 있었다.

NO 연구의 시초는 19 세기로 거슬러 올라가는데, 당시 nitroglycerin 등의 organic nitrate 는 협심증에 진통효과가 있는 것으로 알려져 있었다. 1980년대 초 NO 는 혈관이완 효과를 갖는 endothelial-derived relaxing factor (EDRF)가 혈관의 내피세포에서 분리됨이 관찰되었고, 이 인자의 정체는 NO 임이 밝혀졌으며, NO 가 혈압

조절의 중요한 인자임이 제시되었다. 1980년 Furchgott와 Zawadzki<sup>42)</sup>가 혈관내피 세포가 있어야만 혈관 확장인자에 의하여 혈관이 acetylcholine에 반응하여 이완된다는 사실을 처음으로 보고하였으며, 그 이후 이 매우 불안정하고 잘 확산되는 혈관확장인자의 생물학적 기능이 일산화질소의 기능과 매우 흡사하다고 알려지게 되었다. 1985년 Stuehr와 Marletta<sup>43)</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 제 2 전령 물질의 하나로 세포질 내에서 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 L-citrulline을 합성하는 과정에서 생성된다. NO의 주요 기능은 혈관 평활근을 이완시키는 endothelium-derived relaxing factor로서 처음 보고되었으나<sup>44)</sup> 그 외에 국소 신경 전달 물질로서의 역할을 담당하며<sup>45)</sup>, 혈소판의 응집과 부착을 억제하고<sup>46)</sup>, 대식 세포의 항염증 작용이나 항암 작용 등에도 관여<sup>10)</sup> 하는 것으로 알려져 있다.

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 아미노산 L-arginine으로부터 생성이 되며 NOS에는 endothelial(eNOS), inducible(iNOS), neural(nNOS) 3가지가 존재하며 특히, iNOS는 Ca<sup>2+</sup> - calmodulin에 독립적으로 작용하고 NO를 생성하여 많은 병리학적 자극을 유발하는 것으로 알려져 있다. NO는 세포내 cGMP의 농도를 변화시켜 혈관 이완에 관여하고 혈관의 평활근 세포 증식을 억제하며, 혈관내피 세포에의 혈소판 응집을 억제하며, 만성적으로 NO 합성을 억제할 경우 고혈압과 신장의 손상을 가져온다는 보고가 있다<sup>47)</sup>. 신기능의 감소에 관여하는

여러 가지 요인들 중 혈역학적 변화가 중요하며, NO 는 신장의 혈역학적 변화와 염증반응을 조절하는데 중요한 인자로 알려져있다<sup>48)</sup>. 신장에서 3 가지 모두 발현되는 것으로 알려져 있으며<sup>13)</sup> NOS 의 다른 아형들에 의존한다. Inducible 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>49)</sup> 둘째, 미토콘드리아의 세포 호흡이나 DNA 합성에 관여하는 주요 효소의 철 함유 부위 (iron containing moiety)에 결합함으로써 세포에 대한 독성을 유발하고<sup>50)</sup> 셋째, proinflammatory cytokine 인 TNF 나 IL-1 을 유도하여 염증 반응을 촉진시킬 수 있다는 것<sup>51)</sup> 등이다. Noiri 등<sup>52)</sup>도 허혈에 의한 rat 신장에서 antisense oligodeoxynucleotide 에 의해 iNOS 의 활동을 감소시켜 iNOS mRNA 를 억제함으로써 신장 세뇨관 손상이 감소를 보여주었다. 더구나 iNOS 가 없는 mice 에서 얻어진 신장 세뇨관은 허혈성 손상에 대한 저항성이 있음을 보여주었다<sup>53)</sup>. 본 연구에서도 사이클로스포린 반응성 산소종의 발생을 관찰할 수 있었으며 iNOS 억제제와 green tea polyphenol 투여군에서 반응성 산소종의 발생이 줄고 신장 세포가 회복됨을 관찰할 수 있었다.

근래에 lipid peroxidation 이 중요한 인자로 보고되고 있는데, 세포막에서 고농도의 포화지방산이 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 된다는 것이다<sup>54-56)</sup>. 한편 Wang 등<sup>9)</sup>은 uninephrectomized rat 에서 사이클로스포린을 복용

시켰을 때 신피질 malondialdehyde 가 사이클로스포린의 투여용량을 늘일수록 증가함을 관찰하였고, 사이클로스포린과 lipid scavenger 인 비타민 E 를 동시에 투여하니 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 흰쥐에서 malondialdehyde 가 증가함을 관찰하였으며 green tea polyphenol 을 투여하였을 때 유의있게 malondialdehyde 가 감소함을 관찰하였고 항산화 효과를 나타내는 지표들이 모두 회복됨을 관찰할 수 있었다.

Green tee polyphenol 은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate, (-)-gallocatechin 3-O-gallate, (-)-epicatechin 3-O-gallate, (-)-epigallocatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epicatechin 그리고 catechin 등으로 구성되어 있다. 이중에서 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)가 green tea polyphenol 의 주된 성분이며 arginine 에 의해 유발된 신손상을 요독으로부터 회복시켜주는 중요한 성분이다<sup>57)</sup>. EGCG 가 생체에 미치는 영향에 대한 작용 기전은 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 억제한다고 알려져 있다. 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 있는 것으로 알려져 있다<sup>58)</sup>. 본 연구에서도 사



이클로스포린 단독 투여군에서 항산화 효소인 glutathione(GSH), Catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)의 활성도가 감소하는 것을 관찰하였으며, green tea polyphenol 병합 투여 했을 때 항산화 효소들이 상승하고 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다.

Mason 등 <sup>59)</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>60)</sup> 이와 함께 간질의 섬유화가 발생하는 것이다. 또 장기간 안지오텐신 II 를 투여한 백서에서 사이클로스포린 신독성이 있는 사람 및 동물 신조직 및 혈장 내 레닌 치가 증가되어 있고, 사이클로스포린 신독성시 안지오텐신 전환효소 억제제 또는 안지오텐신 수용체 길항제를 쓰면 간질의 섬유화가 줄어든다는 점 <sup>61)</sup>도 레닌-안지오텐신-알도스테론 계의 관여를 뒷받침한다. Green tea polyphenol 이 레닌-안지오텐신-알도스테론 계에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 보다 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

사이클로스포린 급성 독성의 특징적인 형태학적 변화로는 내형질 세망의 부종, 근위 세뇨관 상피 세포질 내 공포 형성의 소견이 알려져 있다 <sup>62)</sup>. 본 연구에서도 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 대조군과 유사한 소견을 관찰하였다.

## V. 결론

본 연구에서 green tea polyphenol 의 혈중 농도를 보다 안정하게 유지하고 사이클로스포린과 직접적인 약리 작용을 방지하기 위하여 다른 경로로 흰쥐에 투여하였다. 사이클로스포린의 신독성에 대한 신손상의 지표로서 혈청 BUN, 크레아티닌을 측정하였으며 사이클로스포린 투여군을 포함한 모든 군에서 유의있는 차이를 보이지 않았다. 혈청 사이클로스포린 농도를 측정하여 사이클로스포린 농도에 변화를 주는지 여부를 알아보았고 green tea polyphenol 병합 투여군과 iNOS inhibitor 병합 투여군에서 사이클로스포린 단독 투여군과 유의있는 차이를 보이지 않아 green tea polyphenol 은 혈청 사이클로스포린 농도에는 아무런 영향을 미치지 않는다는 관찰하였다. 모든 실험 대상 흰쥐에서 소변 단백질 정량 검사를 실시하였으며 사이클로스포린 군에서 대조군에 비하여 유의있게 상승하였고, green tea polyphenol 병합 투여군에서 사이클로스포린 투여군에 비하여 유의있게 감소하고 대조군과는 거의 차이가 없는 것을 관찰하였다. 이는 iNOS inhibitor 를 투여 했을 때와 유사한 결과를 보여 작용 기전에 NO 와 관련이 있음을 알 수 있었다. 특히, green tea polyphenol 병합 투여군이 iNOS inhibitor 군에 비하여 단백뇨 감소 효과가 뛰어난 것으로 보아 green tea polyphenol 의 항단백뇨 효과가 NO 이외의 다른 효과도 함께 가지고 있음을 시사하였다. 지질 과산화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 신장 조직의 mitochondria 를 분리하여 malondialdehyde 를 측정하였으며 사이클로스포린 투여군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, 사이클로

스포린과 green tea polyphenol 병용 투여군에서는 사이클로스포린 투여군에 비하여 유의있게 감소하였고 정상 대조군에 비하여 유의있게 증가한 소견은 없었다. 이는 green tea polyphenol의 항단백뇨 효과가 NO scavenger로서 지질 과산화를 억제하는 것임을 보여주는 것이다. 또한 green tea polyphenol의 항단백뇨 효과에 레닌-안지오텐신-알도스테론 계를 억제시키는 기전의 관여 여부와 안지오텐신 전환효소 억제제나 안지오텐신 수용체 차단제와 병합 투여에 대한 추가적인 연구는 더 필요할 것을 생각된다.

결론적으로 본 연구에 의하면 사이클로스포린 급성 신장 손상에 의한 단백뇨의 기전이 지질 과산화에 관여하고 NO 생성과 연관이 있으며, green tea polyphenol을 병용 투여 하였을 때 산소 유리기를 제거하고 지질 과산화를 차단하며 사이클로스포린의 급성 신장 손상에 대한 단백뇨를 줄일 수 있으며 사이클로스포린 농도에는 영향을 미치지 않음을 관찰하였다. 이에 사이클로스포린을 복용하는 신장 이식 환자에 green tea polyphenol을 병용투여 함으로써 사이클로스포린 급성 신장 손상에 따른 단백뇨를 예방적으로 줄일 수 것으로 생각된다

## 참 고 문 헌

1. Hess AD : Cyclosporine. Immunobiologic aspects in transplantation, in kidney transplant rejection. Diagnosis and treatment. 2<sup>nd</sup> ed. Edited by Burdick JF, Racusen KC, Solez K, Williams GM, New York, Marcel Dekker Inc, p567-599, 1992
2. Borel JF : Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. Immunology 31(4):631-41, 1976
3. Gordon MY, Singer JW : Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man. Nature 31;279(5712):433-4, 1979
4. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K : Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet 23-30;2(8104-5):1323-7, 1978
5. Powles RL, Barrett AJ, Clink H, Kay HE, Sloane J, McElwain TJ : Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. Lancet 23-30;2(8104-5):1327-31, 1978
6. van Rijthoven AW, Dijkmans BA, Goei The HS, Hermans J, Montnor-Beckers ZL, Jacobs PC, Cats A : Cyclosporin treatment for rheumatoid arthritis: a placebo controlled, double blind, multicentre study. Ann Rheum Dis 45(9):726-31, 1986
7. Tejani AT, Butt K, Trachtman H, Suthanthiran M, Rosenthal CJ, Khawar MR : Cyclosporine A induced remission of relapsing nephrotic syndrome in children. Kidney Int 33(3):729-34, 1988

8. Neuhaus TJ, Burger HR, Klingler M, Fanconi A, Leumann EP : Long-term low-dose cyclosporin A in steroid dependent nephrotic syndrome of childhood. *Eur J Pediatr* 151(10):775-8, 1992
9. Wang C, Salahudeen AK : lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity : effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934, 1995
10. Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ : Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 50(3):487-92, 1990
11. Ito, S., Ren, YL., "Evidence for the role of nitric oxide in the macula densa control of glomerular hemodynamics" *J Clin Invest* 92:1093-1098, 1993
12. Radermacher, J., Klanke, B., Schurek, HJ., Stotte, HF., Frohlich, JC., "Impotence of NO/EDRF for glomerular and tubular function: studies in the perfused rat kidney." *Kidney Int* 41:1549-1559, 1992
13. Shultz, PJ., Tolins, JP., "Adaptation to increased dietary salt intake in the rat: Role of endogenous nitric oxide" *J Clin invest* 91:642-650, 1993
14. Shultz, PJ., Schorer, AE., Raij, L., "Effects of endothelium-derived relaxing factor on rat mesangial cells" *Am J physiol* 258:F162-167, 1990
15. Raij, L., Shultz, PJ., "Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: Effects on and production of mesangial cell and glomerulus" *J Am Soc Nephro* 3:1435-1441,1993
16. Hruby, Z., Beck, KF., "Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells." *Clin Exp Immunol* 107:76-82, 1997

17. Ignaro, LJ., Buga, GM., Wood, KS., Byrns, RE., Chaudhuri, G., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1987, 84, 9265
18. Knowles, RJ., Salter, M., Brooks, SL., Moncada, S., Biochem Biophys Res Commun, 1990, 172, 1042
19. Meyer-Lehnert H, Schrier RW : Cyclosporine A enhances vasopressin-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in mesangial cells. *Kidney Int* 34(1):89-97, 1988
20. 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
21. Graham, HN., “ Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry” *Prev Med* 21, 334-350, 1992
22. Morris PJ : Cyclosporine A. *Transplantation* 32:349-354, 1981
23. Morris PJ : Cyclosporine. In : Morris PJ. Ed, *Kidney Transplantation* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company pp 179-201, 1994
24. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T L Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis, *Kidney Int* 39:550-556, 1991
25. El Nahas AM : Pathways to renal fibrosis, *Exp Nephrol* 3:71-75, 1995
26. No W, Brecklin C, Garber SL, Song RH, Pegorado 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
27. Troung LD, Farhood A, Tasby J, Gillum D : Experimental chronic ischemia : Morphology and immunologic studies. *Kidney Int* 41:1676-1689, 1992

28. 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
29. 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
30. Strom EH, Epper R, Mihatsch MJ: Cyclosporine associated arteriopathy : the rennin producing vascular smooth muscle cells are more sensitive vascular smooth muscle cells are more sensitive to cyclosporine toxicity. *Clin Nephrol* 43:226-231, 1995
31. 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 En gl J Med* 314:12193-1298 1986
32. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J : Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902, 1992
33. Wang C, Salahudeen AK : lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity : effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934, 1995
34. Shah SW : The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Ann Rev Physiol* 57:245-262, 1995
35. Sundaesan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T : Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for palatlet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299, 1995
36. Sen CK, Packer L : Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*.

1996 ;10(7):709-20.

37. 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
38. Sies H : Oxidative stress. Oxidant and Antioxidant, p650, Academic Press, London, 1991
39. 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.
40. 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.
41. Owens MW, Milligan SA, Jourde'heuil 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
42. Forchgott, RF., Zawadki, JV., "The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine" *Nature*, 1980, 288, 373
43. Stuehr, DJ., Marletta, MA., "Inhibition of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophage by BCG infection, lymphokines or interferon gamma" *J Immunol* 1987, 139, 518
44. Moncada, S., Palmer, RMJ., Higgs, EA., "Nitric oxide, physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Review.* 1991, 43, 109-142



45. Bult, H., Boeckstaens, GE., Pelckmans, PA., Jordaens FH., van Maercke YM., Herman, AG, "Nitric oxide as inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." *Nature*. 1990, 345, 346-347
46. 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
47. 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
48. Simns, LA., "Interrelations of lipid and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 contries" *Am J Cardiol*. 1986, 57, 5G-10G
49. 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*. 1006, 93, 677-6774
50. Nussler, AK., Basillar TR., "Inflammation and immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase" *J Leukoc Biol*. 1993, 54,171-178
51. 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
52. 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

53. 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
54. 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
55. 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.
56. 신언성, 김영옥, 김용진, 박용훈 : 실험쥐에서 cyclosporine A 신독성 경감을 위한 vitamine E 동시 투여 효과. *대한이식학회지* 11-20, 1997
57. 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
58. 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
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Whiting PH, Thomson AW, Blair JT, Simpson JG : Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br J Exp Pathol.* 1982 Feb;63(1):88-94.