creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

dCollection

박사학위논문

급성콩팥손상 모델에서
머캅토에탄올의 보호 효과

문 다 은

제주대학교 대학원

차세대융복합과학기술협동과정

2023년 8월

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

급성콩팥손상 모델에서
머캅토에탄올의 보호 효과

지도교수 김 진 우

문 다 은

이 논문을 이학 박사학위논문으로 제출함

2023년 08월

문다은의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 등 순

위 원 윤 상 필

위 원 손 영 욱

위 원 장 희 성

위 원 김 진 우

제주대학교 대학원

2023년 08월

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

The protective effect of 2-mercaptoethanol in acute kidney injury

Daeun Moon
(Supervised by Professor Jinu Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Interdisciplinary Graduate Program in Advanced Convergence Technology & Science

2023. 08.

This thesis has been examined and approved.

Chair Dong Sun Lee
Member Sang-Pil Yoon
Member Youngok Son
Member Hee-Seong Jang
Member Jinu Kim

Interdisciplinary Graduate Program in Advanced Convergence Technology & Science, Graduate School
Jeju National University

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목차

초록 1

용어 3

그림 목록 7

Ⅰ. 서론 9

Ⅱ. 재료 및 방법 12

1. 실험동물 및 허혈-재관류 손상 수술 12
2. 약물 투여 12
3. 콩팥 기능 검사 13
4. 면역조직염색 13
5. 콩팥 요세관 손상 평가 14
6. Western blot 분석 15
7. 통계 분석 16

Ⅲ. 결과 17

1. 머캅토에탄올의 전처치는 허혈-재관류 손상으로 인한 콩팥의 기능 저하와 조직학적 손상을 보호한다 17
2. 머캅토에탄올의 후처치는 허혈-재관류 손상으로 인한 콩팥의 기능 저하와 조직학적 손상을 감소시킨다 22
3. 머캅토에탄올은 허혈-재관류 손상으로 인한 요세관 상피세포의 DNA 이중가닥 절단을 막는다 27
4. 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올은 ATM 신호전달경로의 활성을 유도한다 32
5. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올은 GPX4 항산화 단백질을 선택적으로 과발현 시킨다 36
6. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올은 ferroptosis에 영향을 주지 않는다 38
7. GPX4 억제는 허혈-재관류 손상 동안 머캅토에탄올에 의한 DNA 손상의 보호 효과를 상쇄 시킨다 40
8. GPX4 억제는 허혈-재관류 손상 동안 머캅토에탄올에 의한 콩팥 기능 저하와

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

요세관 손상의 보호 효과를 상쇄 시킨다 44
9. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올이 p38, ERK, AKT의 활성을 유도한다 47
Ⅳ. 고찰 52
Ⅴ. 참고문헌 59
영문 초록 68

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

초록

콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI)은 급성콩팥손상(acute kidney injury, AKI)의 대표적인 모델로서 요세관 상피세포(tubular epithelial cell)의 세포사(cell death)를 유도한다. DNA 이중가닥 절단(DNA double-strand breaks)은 허혈-재관류 손상으로 인한 요세관 세포사의 주요 원인 중 하나이다. 다른 연구팀에서는 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)이 송아지의 가슴샘(thymus)과 소 배아(embryo)에서 정제된 DNA에서 DNA 이중가닥 절단을 보호한다고 보고하였다. 이를 바탕으로 본 연구자는 머캅토에탄올 투여가 DNA 이중가닥 절단을 약화시켜 허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능 저하와 조직학적 손상을 감소시키는지 여부를 확인하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 콩팥 기능이 저하되고 조직학적 손상이 유발되었다. 그러나 머캅토에탄올의 전처치(pre-treatment)와 후처치(post-treatment)는 허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능 저하와 요세관 손상을 유의하게 감소시켰다. 그리고 콩팥에서 허혈-재관류 손상은 DNA 이중가닥 절단을 유도하였으며 주로 콩팥 요세관 상피세포에서 관찰되었다. 그러나 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서는 허혈-재관류로 인한 DNA 이중가닥 절단이 억제되었다. 허혈-재관류 손상 후 DNA 손상 반응(DNA damage response, DDR)의 신호전달경로(signaling pathway)의 upstream sensor kinase인 ataxia telangiectasia mutated(ATM)와 ataxia telangiectasia and Rad3 related(ATR)의 활성이 증가하였고, 머캅토에탄올을 투여한 콩팥에서는 ATM의 활성만 더욱 향상되었다. 또한 ATM 단백질의 신호전달경로에서 downstream effector kinase를 측정하였을 때, 머캅토에탄올 투여는 허혈-재관류로 인해 감소된 checkpoint kinase 1(Chk1), checkpoint kinase 2(Chk2), X-ray repair cross-complementing protein 1(XRCC1)의 활성을 현저하게 증가시켰다. 이는 허혈-재관류 손상에서 머캅토에탄올이 ATM 신호전달경로의 활성을 유도시킨다는 사실을 알 수 있다. 다음으로 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 glutathione peroxidase 4(GPX4), catalase, copper-zinc superoxide dismutase(CuZnSOD), manganese superoxide dismutase(MnSOD)의 단백질 발현이 모두 감소하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그러나 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올 투여는 GPX4 단백질의 발현만 유의하게 향상시켰다. 머캅토에탄올에 의해 증가된 GPX4 발현을 억제하였을 때, 머캅토에탄올 투여로 인해 감소된 DNA 이중가닥 절단이 다시 유발되었고, ATM 관련 신호전달경로가 감소하였으며, 이를 통해 허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능 저하와 요세관 손상을 다시 유도하였다. 마지막으로, 허혈-재관류 손상은 mitogen-activated protein kianse(MAPK) 중 p38과 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 활성을 증가시켰고, protein kinase B(AKT)의 활성을 유도하였다. 그리고 콩팥 허혈-재관류로 손상받은 생쥐에서 머캅토에탄올 투여는 p38, ERK, AKT의 활성을 더욱 증가시켰다. 그러나 머캅토에탄올에 의해 활성화된 p38, ERK, AKT가 GPX 발현과 관련이 있는지 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 결론적으로 본 연구자는 머캅토에탄올이 콩팥 허혈-재관류 손상에서 GPX4의 발현을 증가시키고 ATM 관련 신호전달의 활성을 통해 DNA 이중가닥 절단을 억제함으로써 콩팥의 기능 저하와 요세관 손상을 보호함을 입증하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

용어

우리말	영어 (약어)
DNA 손상 반응	DNA damage response (DDR)
균질화	homogenization
근위세뇨관	proximal tubule
급성콩팥손상	acute kidney injury (AKI)
기능이상	dysfunction
기전	mechanism
단일가닥 절단	single strand break
머캅토에탄올	2-mercaptoethanol (2-ME)
면역조직화학염색	immunohistochemical stain
면역형광염색	immunofluorescent stain
바깥수질	outer medulla
바깥수질 바깥줄무늬층	outer stripe of the outer medulla (OSOM)
배아	embryo
분비	secretion
비모수 검정	non-parametric test
사구체	glomerulus
사구체여과율	glomerular filtration rate (GFR)
사후	post hoc
산화	oxidation
산화환원	redox
산화 스트레스	oxidative stress
상피세포	epithelial cell
세 번째 구역	S3 segment
세포분화	cell differentiation
세포사	cell death

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

우리말	영어 (약어)
세포사멸	apoptosis
세포주기 정지	cell cycle arrest
세포증식	cell proliferation
세포질	cytoplasm
세포핵	nucleus
손실	loss
솔가장자리	brush border
신호전달경로	signaling pathway
억제제	inhibitor
여과	filtration
염색체	chromosome
요관싹	ureteric bud
요세관	tubule
요세관 상피세포	tubular epithelial cell
요세관 속공간	tubular lumen
요세관 손상 점수	tubular injury score
요세관 위축	tubular atrophy
원위요세관	distal tubule
원주	cast
이중가닥 절단	double strand break
이중 면역형광염색	double immunofluorescent stain
인산화	phosphorylation
자유도	degree of freedom
재관류	reperfusion
재수화	rehydration
재흡수	reabsorption
전처치	pre-treatment

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

우리말	영어 (약어)
정규 분포	normal distribution
조직병리학	histopathology
지질과산화	lipid peroxidation
지표	parameter
집합관	collecting duct
체외	*in vitro*
치사량	lethal dose
탈파라핀화	deparaffinization
투여	injection
펜토바르비탈 나트륨	pentobarbital sodium
피질	cortex
콩팥단위	nephron
콩팥동맥	renal artery
콩팥섬유화	renal fibrosis
콩팥 요세관	renal tubule
콩팥정맥	renal vein
콩팥 허혈	kidney ischemia
평균	mean
표준오차	standard error of the mean (SEM)
항산화제	antioxidant
항원 복구	antigen retrieval
허혈-재관류 손상	ischemia-reperfusion injury (IRI)
헨레고리	loop of Henle
혈관희박화	vascular rarefaction
혈장	plasma
활성산소종	reactive oxygen species (ROS)
활성	activation

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

우리말	영어 (약어)
후처치	post-treatment
희생	sacrifice

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그림 목록

그림 1. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 기능 저하에 대한 머캅토에탄올의 보호 효과 20

그림 2. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 요세관의 조직학적 손상에 대한 머캅토에탄올의 보호 효과 21

그림 3. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 기능 저하에 대한 머캅토에탄올의 치료 효과 24

그림 4. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 요세관의 조직학적 손상에 대한 머캅토에탄올의 치료 효과 25

그림 5. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 γH2AX의 발현 증가에 대한 머캅토에탄올의 억제 효과 29

그림 6. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 γH2AX가 발현하는 세포 수 증가에 대한 머캅토에탄올의 억제 효과 30

그림 7. 허혈-재관류 손상 받은 콩팥에서 머캅토에탄올에 의한 ATM 신호전달경로의 활성 34

그림 8. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 GPX4 발현 감소에 대한 머캅토에탄올의 억제 효과 37

그림 9. 허혈-재관류 손상 후 머캅토에탄올에 의한 SLC7A11 발현 변화 39

그림 10. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 DNA 보호에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과 42

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그림 11. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 콩팥 기능 보호에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과 45

그림 12. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 조직학적 요세관 손상에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과 46

그림 13. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올에 의한 MAPK 활성 ... 49

그림 14. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올 투여에 의한 AKT 활성 51

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서론

급성콩팥손상(acute kidney injury, AKI)은 콩팥 기능이 급격하게 악화되는 상황을 말하며 콩팥 대체 요법이 필요한 환자의 높은 사망률(mortality rate)과 관련이 있다[1-3]. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI)은 급성콩팥손상의 주요 원인이며, 콩팥의 혈류가 중단 또는 급격히 감소하거나 독성에 의해 발생한다[4]. 콩팥 허혈(kidney ischemia)이 일어나는 동안 바깥수질(outer medulla)에 존재하는 치밀한 모세혈관얼기(capiilary plexus)에서 적혈구들이 정체되기 때문에 저산소증(hypoxia)이 유발되고, 이후 혈액이 콩팥으로 재관류(reperfusion)되면서 공급된 산소(oxygen)로부터 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다[3,5]. 이로 인해, 바깥수질 바깥줄무늬층(outer stripe of the outer medulla, OSOM)에 위치하는 여러 가지 요세관(tubule)들이 손상을 받는다[6]. 콩팥 요세관(renal tubule)은 크게 콩팥발생모체(metanephrogenic blastema)에서 기원한 콩팥단위(nephron)와 요관싹(ureteric bud)에서 기원한 집합관(collecting duct)으로 나누어지고, 콩팥단위는 다시 사구체(glomerulus)를 감싸고 있는 콩팥소체(renal corpuscle)부터 근위요세관(proximal tubule), 헨레고리(loop of Henle) 및 원위요세관(distal tubule)으로 나눌 수 있다[7]. 이중 허혈-재관류 손상에 상대적으로 손상을 받는 요세관은 근위요세관이며 특히 바깥수질 바깥줄무늬층에 위치하는 세 번째 구역(S3 segment)이 가장 심한 손상을 받는 요세관이다[3]. 조직병리학(histopathology)적 관점에서 살펴보면, 콩팥 허혈-재관류 손상의 주요한 특징은 요세관 상피세포(tubular epithelial cell)의 세포사(cell death)이며 이는 사구체여과율(glomerular filtration rate, GFR)의 감소, 나트륨 배설의 증가 및 포도당 재흡수 억제 등과 같은 콩팥의 기능이상(dysfunction) 정도와 정비례한다[2,8]. 허혈-재관류로 인해 손상된 콩팥은 뇌 또는 심장과는 달리 회복 능력이 뛰어나지만, 손상이 심할 경우 회복 능력이 급격히 저하되고 콩팥섬유화(renal fibrosis), 사구체경화증(glomerulosclerosis), 혈관희박화(vascular rarefaction) 등의 만성질환 특징을 나타낼 수 있다[9,10]. 따라서, 급성콩팥손상으로부터 방어할 수 있고 손상 이후 콩팥 요세관의 세포사와 콩팥의 기능이상을 회

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

복하여 만성질환으로의 이행을 막을 수 있는 신호전달경로를 밝히는 것이 중요하다.

세포에서 가장 중요한 요소이며 유전정보를 지니고 있는 DNA의 손상은 급성 콩팥손상으로 인한 요세관 세포사의 주요 원인 중 하나이며 다른 여러 형태의 조직 손상에서도 발견된다[11-13]. 급성콩팥손상이 진행되는 동안 다양한 유형의 DNA 손상이 나타나는데, 염기쌍의 불일치(mismatched base pair), 염기 손실(base loss), 단일 또는 이중가닥 절단(single or double strand break), 산화(oxidation) 또는 메틸화(methylation) 같은 염기의 화학적 변화 등으로 나타난다[14]. 특히 DNA 이중가닥 절단은 DNA 단일가닥 절단보다 복구가 복잡하기 때문에 더 위험한 유형으로 간주된다[15]. DNA 이중가닥 절단이 유도되면 세포는 즉각적으로 반응하기 위해 특정한 신호전달경로(signaling pathway)를 통해 세포증식(cell proliferation) 및 세포분열(cell division)을 멈추고 손상된 DNA를 복구하게 된다. 그러나 복구를 할 수 없을 정도로 비가역적인(irreversible) DNA 손상을 가진 세포는 세포사멸(apoptosis) 및 세포노화(cellular senescence)와 같은 과정으로 진행된다. 이러한 DNA 손상에 반응하는 세포 내 일련의 과정을 DNA 손상 반응(DNA damage response, DDR)이라고 한다. 이 DNA 손상 반응을 조절하는 신호전달경로는 DNA 손상의 유형과 정도에 따라 선택적으로 활성(activation)이 일어난다[16]. DNA 손상반응은 ataxia telangiectasia mutated(ATM), ataxia telangiectasia and Rad3 related(ATR) 및 DNA-dependent protein kinase(DNA-PK)를 포함한 upstream sensor kinase 중 하나 이상의 단백질 활성을 통해 시작된다[17]. 이후 upstream sensor kinase 단백질의 활성은 checkpoint kinase 1(Chk1) 및 checkpoint kinase 2(Chk2)를 포함하는 downstream effector kinase의 활성을 유도하고 DNA 복구 또는 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 일으킨다[18]. 이전에 보고된 체외(*in vitro*) 실험결과들을 살펴보면, 일부 체세포배양(somatic cell culture)에서 항산화제(antioxidant)로 이용되고 있는 thiol 화합물인 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)은 송아지의 가슴샘(thymus) 조직에서 정제된 DNA[19], 혐기성(anaerobic) 조건 하의 DNA[20], 저온에 저장된 소 배아(embryo)의 DNA[21]에서 DNA 이중가닥 절단을 보호하였다. 머캅토에탄올의 효과

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

를 나타내는 이전 실험결과들을 토대로, 콩팥 허혈-재관류 손상의 생쥐 모델에서 머캅토에탄올을 투여하면 DNA 이중가닥 절단이 감소하는지, 그리고 DNA 손상 반응이 일어나게 되는지, 결론적으로 급성콩팥손상이 감소하는지를 확인하고자 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 허혈-재관류 손상 수술

본 동물실험에 사용된 8~10주령의 수컷 C57BL/6 생쥐는 오리엔트 바이오(경기도 성남시)에서 구입하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회에서 승인한 계획서(승인번호: 2018-0022 및 2021-0045)에 따라 수행하였다. 모든 생쥐는 제주대학교 실험동물센터에서 온도 22℃, 습도 55% 내외에서 12시간 동안 명암 주기를 유지하고 생쥐 전용 표준사료와 멸균된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상 수술은 이전에 보고된 방법을 그대로 사용하였다[9-10,22-24]. 간단히 설명하면, 펜토바르비탈 나트륨(pentobarbital sodium; 60 mg/kg body weight; 한림제약)을 복강 내 주사하여 마취하였다. 마취된 생쥐의 양측 옆구리를 절개하여 콩팥을 노출시킨 뒤, 콩팥문(renal hilum)으로 접근하여 콩팥동맥(renal artery)과 콩팥정맥(renal vein)을 핀셋으로 분리하였다. 그리고 생쥐용 microclip(Roboz 회사, 미국)으로 콩팥동맥과 콩팥정맥을 30분 동안 막는 허혈을 진행하였다. 양측 콩팥들을 허혈시키는 동안 DC temperature control system(FHC 회사, 미국)을 이용하여 생쥐의 체온을 36.5~37.5℃로 유지하였다. 이후 microclip을 제거하고 허혈로 인해 검붉은색을 띄는 콩팥 색깔이 재관류 과정을 통해 선홍색으로 되돌아오는지 관찰하였다. 허혈 이후 재관류는 24시간 및 48시간 동안 이루어졌다. Sham 수술은 microclip을 이용한 허혈 과정을 제외한 모든 허혈 수술 과정과 동일하게 진행되었다.

2. 약물 투여

머캅토에탄올(Sigma-Aldrich 회사, 미국)의 최적 투여량을 확인하기 위해 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올을 몸무게 kg당 3, 10, 또는 30 mg을 수술 24시간 전부터 매일 복강으로 투여(injection)하였다. 머캅토에탄올의 50% 치사량(lethal dose)이 생쥐에게 복강 내 투여하였을 때 몸무게 kg당 약 322 mg이기 때문에 위 투여량을 선택하였다[25]. 추가적으로 허혈-재관류 손상 이후 머캅토에탄올의 치료 효과를 살펴보기 위해 허혈 후 6시간 또는 24시간부터 몸무게 kg

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

당 30 mg의 머캅토에탄올을 매일 복강으로 투여하였다. 마지막으로, 항산화 효소 glutathione peroxidase 4(GPX4)의 기능을 억제하기 위해 Ras-selective lethal 3(RSL3, Sigma-Aldrich 회사, 미국)를 사용하였다. 0.9% 식염수를 함유한 2% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해된 RSL3(10 mg/kg body weight/day[26])는 머캅토에탄올을 투여한 후 1시간 뒤에 매일 복강으로 투여하였다.

3. 콩팥 기능 검사

헤파린(heparin)이 처리된 micro-hematocrit capillary tube(Kimble Chase 회사, 미국)를 이용하여 수술 후 24시간과 48시간에 생쥐의 눈뒤굴(retro-obital sinus)에서 혈액을 채취하였다. 혈액이 담긴 tube를 상온에서 17,000 x g으로 10분 동안 원심분리한 후 상층액에 분리되어 있는 혈장(plasma)을 가지고 콩팥 기능을 검사하였다. 혈장 내 creatinine과 blood urea nitrogen(BUN)의 농도는 각각 QuantiChrom 분석 키트를 사용하여 측정되었다(BioAssay System 회사, 미국)[27,28]. 간단히 설명하면, 혈장 creatinine의 농도는 혈장 30 ㎕를 96-well plate로 옮겨 담고 분석 키트의 working 시약 200 ㎕를 바로 96-well plate에 분주한 후 SpectraMax i3x multi-mode micro plate reader(Molecular Devices 회사, 미국)에서 510 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 혈장의 blood urea nitrogen 농도는 혈장 5 ㎕를 이용하여 520 nm 파장으로 동일한 과정을 통해 흡광도를 측정하였다.

4. 면역조직염색

적출한 콩팥은 4℃ 온도에서 4% paraformaldehyde(Tech and Innovation 회사, 대한민국)에 넣고 18시간 동안 고정되었다. 콩팥 조직의 파라핀 절편을 이용한 면역조직화학염색(immunohistochemical stain)은 이전에 보고된 방법과 동일하게 수행되었다[3,24,29,30,31]. 요약하면, 콩팥 조직의 파라핀 절편은 xylene을 이용하여 탈파라핀화(deparaffinization)하고 ethanol 농도 변화를 통해 재수화(rehydration)시킨 후, 항원 복구(antigen retrieval)를 위해 20 mM sodium citrate에서 1분간 100℃에서 고압증기멸균하였다. 이후, periodic acid-Schiff(PAS) 염색 또는

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

H2A.X variant histone phosphorylated at serine 139(γH2AX) 항체(Santa Cruz Biotechnology 회사, 미국)를 이용하여 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로 반응시킨 조직 절편은 phosphate-buffered saline(PBS)을 이용하여 씻어낸 후, 2차 항체 peroxidase anti-mouse IgG 또는 peroxidase anti-rabbit IgG(Vector Laboratories 회사, 미국)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 DAB Substrate 키트(Vector Laboratories 회사)를 이용하여 발색을 유도하였다. 콩팥 내 γH2AX가 염색된 요세관의 종류를 감별하기 위해 면역형광염색(immunofluorescent stain) 방법으로 이전에 보고된 방법과 동일하게 수행하였다[2,6,24,30,32]. 콩팥 조직의 파라핀 절편은 탈파라핀화, 재수화, 항원 복구 과정을 거친 후, γH2AX(Santa Cruz Biotechnology 회사), aquaporin 1(AQP1, Alomone Labs 회사, 이스라엘) 또는 Na-K-Cl cotransporter 2(NKCC2, Proteintech 회사, 미국) 항체를 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. AQP1 항체는 근위세뇨관을 구분하기 위해, NKCC2 항체는 원위세뇨관을 구분하기 위해 각각 사용되었다. 2차 항체로 Texas-red anti-mouse IgG 또는 Fluorescein anti-rabbit IgG (Vector Laboratories 회사)를 상온에서 60분 동안 반응시키고 세포핵(nucleus) 염색을 위해 4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI, Sigma-Aldrich 회사)를 1분 동안 반응시켰다. Eclips Ni 형광현미경(니콘 회사, 일본)을 이용하여 400배에서 관찰하였다.

5. 콩팥 요세관 손상 평가

요세관 손상 점수(tubular injury score)는 요세관 위축(tubular atrophy) 및 원주(cast)가 관찰되는 요세관 속공간(tubular lumen)의 백분율을 콩팥 요세관 손상으로 나타내었다. 광학현미경의 400배 배율을 통해 PAS로 염색된 콩팥 피질(cortex)과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 전체 요세관의 수와 손상된 요세관의 수를 각각 세었다. 조직 절편 당 무작위로 선택된 5개의 시야에서 계산되었다. 또한, γH2AX가 염색된 요세관 상피세포의 수도 조직 절편 당 무작위로 선택된 5개의 시야에서 계산되었다. 위 모든 과정은 블라인드 방식으로 진행되었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

6. Western blot 분석

액체 질소에서 급속 냉동시킨 콩팥 조직을 차가운 lysis buffer(Thermo Fisher Scientific 회사, 미국)에 넣고 얼음 속에서 균질화(homogenization) 하였다. 균질화된 샘플은 4℃에서 20분 동안 17,000×g에서 원심분리한 후, 균질액의 상층액에서 단백질을 얻었다. 단백질의 농도는 Bradford reagent(sigma-Aldrich 회사)을 이용하여 측정한 후, lane marker reducing sample buffer(Thermo Fisher Scientific 회사)와 혼합하였다. 이 단백질 샘플들은 TGX FastCast acrylamide 키트(Bio-Rad Laboratories 회사, 미국)를 가지고 제조한 12% 및 7% polyacrylamide gel에서 전기영동(electrophoresis)하였고 blotting 과정을 통해 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane(Bio-Rad Laboratories 회사)으로 옮겼다[28,33-36]. 이후 γH2AX(Signalway Antibody 회사, 미국), phospho-ATM(p-ATM; Novus Biologicals 회사, 미국), phospho-ATR(p-ATR; ABclonal Technology 회사, 미국), phospho-Chk1(p-Chk1; ABclonal Technology 회사), phospho-Chk2(p-Chk2; Signalway Antibody 회사), phospho-Xray repair cross complementing protein 1(p-XRCC1; Bethyl Laboratories 회사, 미국), GPX4 (Santa Cruz Biotechnology 회사), catalase(Santa Cruz Biotechnology 회사), copper-zinc superoxide dismutase(CuZnSOD, Santa Cruz Biotechnology 회사), manganese superoxide dismutase(MnSOD; Santa Cruz Biotechnology 회사), solute carrier family 7 member 11(SLC7A11, ABclonal 회사), phospho-p38(p-p38; Cell Signaling Technology 회사, 미국), phospho-c-Jun N-terminal kinase(p-JNK; Cell Signaling Technology 회사), phospho-extracellular signal-regulated kinase(p-ERK; Cell Signaling Technology 회사), phospho-protein kinase B(p-AKT; ABclonal Technology 회사), 또는 β-actin(Santa Cruz Biotechnology 회사) 항체를 4℃에서 18시간 동안 처리하였다. TBS-T로 membrane을 씻은 후, 2차 항체 peroxidase anti-rabbit IgG(Vector Laboratories 회사) 또는 peroxidase anti-mouse IgG(Vector Laboratories 회사)를 상온에서 60분 동안 반응시켰다. Western Lightning chemiluminescence reagent(PerkinElmer 회사, 미국)와 Azure c300 imaging 시스템(Azure Biosystem

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

회사, 미국)을 이용하여 단백질의 발현을 측정하였다. 측정된 단백질 발현의 정도는 AzureSpot 분석 소프트웨어(Azure Biosystems 회사)를 사용하여 수치화되었다.

7. 통계 분석

모든 데이터의 통계 분석은 SigmaPlot 14.0 소프트웨어(Systat Software 회사, 미국)를 사용하였다. 정규 분포(normal distribution)는 Shapiro-Wilk 정규성 검정으로 평가되었다. 만약, 데이터가 정규 분포를 나타내지 않으면 로그(log)로 변환시킨 뒤 다시 정규 분포를 평가하였다. 정규성 테스트를 통과한 데이터는 one-way 또는 two-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석하였고, 각 그룹 비교는 Tukey 사후(post hoc)검정을 이용하여 분석하였다. ANOVA에 대한 결과를 $F_{\alpha,\beta}=\gamma$으로 나타냈으며, 여기서 α, β, γ는 각각 설명된 분산에 대한 자유도(degree of freedom for explained variance), 잔여 분산에 대한 자유도(degree of freedom for residual variance), F 값을 가리킨다. 정규성 가정이 만족되지 않은 데이터는 비모수 검정(non-parametric test) 중 Kruskal-Wallis 검정을 이용하여 분석하였고, 각 그룹 비교는 Student-Newman-Keuls 사후(post hoc)검정을 이용하여 분석하였다. Kruskal Wallis 검정에 대한 결과를 $H=\alpha$, $N_{\beta}=\gamma$으로 나타냈으며, 여기서 α, β, γ는 각각 H 값, 그룹 수, 그룹 당 생쥐의 마리 수를 가리킨다. 모든 데이터는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. p 값이 0.05보다 작을 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 결과

1. 머캅토에탄올의 전처치는 허혈-재관류 손상으로 인한 콩팥의 기능 저하와 조직학적 손상을 보호한다.

허혈-재관류 손상으로 인한 급성콩팥손상에서 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 콩팥 허혈을 유도하고 24시간과 48시간 동안 재관류 시킨 후 콩팥의 기능을 먼저 조사하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상이 24시간과 48시간 동안 진행되었을 때, 혈장 creatinine의 수치가 현저하게 증가였지만, 손상 24시간 이전부터 머캅토에탄올을 농도별로 전처치(pre-treatment)한 생쥐의 혈장 creatinine의 수치는 유의한 감소를 보였다(그림 1B). Sham 수술한 생쥐에서는 머캅토에탄올 전처치에 대한 혈장 creatinine 수치의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 혈장 creatinine 수치의 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상($F_{2,60}$=175.679, p<0.001), 머캅토에탄올($F_{3,60}$=11.417, p<0.001), 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{6,60}$=2.408, p=0.038)에서 유의한 차이를 보였다. 추가적으로 BUN 수치를 측정하였을 때, 허혈-재관류가 24시간과 48시간 동안 진행된 생쥐에서 BUN 수치가 현저하게 증가하였다(그림 1C). 하지만 수술 24시간 이전부터 머캅토에탄올을 농도별로 전처치한 생쥐에서는 허혈-재관류 손상 이후 24시간에서는 유의한 차이가 없었고 48시간에서 BUN 수치가 상당히 감소하였다(그림 1C). 특이한 점은 sham 수술한 생쥐에서 머캅토에탄올을 농도별로 투여하였을 때, BUN 수치가 유의하게 소폭 증가하였다(그림 1C). 혈중BUN 수치의 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상($F_{2,60}$=60.227, p<0.001) 그리고 허혈 재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{2,60}$=12.058, p<0.001)에서 유의한 차이를 보였고, 머캅토에탄올($F_{2,60}$=2.303, p=0.089)에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 비록 sham 수술한 생쥐에서 머캅토에탄올 투여에 의한 혈장 creatinine 수치의 변화는 없었지만, BUN 농도의 증가가 관찰되었기 때문에, 이러한 변화가 머캅토에탄올의 독성으로 유발된 것인지 확인하기 위해 체중 변화를 관찰하였다. 측정 결과, 허혈-재관류 손상 이후

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

생쥐의 체중이 급격히 감소하였지만, 머캅토에탄올 전처치로 인한 체중 변화는 없었다(그림 1D). 체중 변화 결과에 대한 two-way ANOVA 통계 분석에서도 허혈-재관류 손상($F_{1,40}$=1308.412, p<0.001)에만 유의한 차이를 보였고 머캅토에탄올($F_{3,30}$=0.274, p=0.844) 및 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{3,30}$=0.165, p=0.919)에서는 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과들을 종합해보면, 머캅토에탄올의 전처치는 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥의 기능 저하에 방어 효과를 나타낸다는 사실을 보여준다.

다음으로 허혈-재관류로 인한 콩팥의 조직학적 손상에서 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 PAS 염색을 이용한 콩팥 요세관의 구조적 손상 정도를 측정하였다. 콩팥의 기능 지표 중 혈장 creatinine 수치 결과와 유사하게, 허혈-재관류 손상이 24시간과 48시간 동안 진행되었을 때, 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층의 요세관에서 심각한 손상을 유발하였다(그림 2A). 정상 콩팥 조직을 PAS 염색하면, 요세관 상피세포의 세포질(cytoplasm)은 연보라색으로 보이고, 근위요세관 상피세포의 꼭대기쪽 세포막(apical membrane)에 위치한 솔가장자리(brush border)는 빨간색으로 보인다. 특히, 바깥수질 바깥줄무늬층에 위치하는 세 번째 구역 근위요세관의 솔가장자리는 첫 번째와 두 번째 구역 근위요세관의 솔가장자리와 비교하였을 때, 솔가장자리를 구성하는 미세융모(microvilli)의 길이가 두드러지게 길어지기 때문에 PAS 염색에 의해 빨간색이 더욱 두드러지게 나타난다. 그림 2B처럼, 콩팥 허혈-재관류 손상은 요세관 위축, 요세관 속공간의 원주 형성, 그리고 요세관 상피세포의 세포핵 상실을 유도하였다. 피질의 요세관 손상 점수는 허혈-재관류 손상 이후 24시간에서 48시간까지 점차적으로 증가하는 패턴을 보이지만, 바깥수질 바깥줄무늬층의 요세관 손상 점수는 손상 이후 24시간에서도 급격하게 증가하였다(그림 2A). 이는 피질보다도 바깥수질 바깥줄무늬층의 요세관에서 허혈-재관류 손상에 더 민감하게 반응한다는 것을 알 수 있다. 그러나, 손상 24시간 이전부터 머캅토에탄올을 농도별로 전처치한 생쥐의 콩팥은 허혈-재관류 손상에 노출되었을 때, vehicle을 투여한 생쥐의 콩팥에 비해 피질과 바깥수질 바깥줄무뉘층의 요세관 손상 점수가 모두 유의하게 낮게 나타났다(그림 2A). 그리고 sham 수술 이후 머캅토에탄올을 투여한 그룹과 vehicle을 투여한

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그룹의 요세관 손상 점수에서는 유의한 차이가 없었다(그림 2A). 본 요세관 손상 점수를 Kruskal-Wallis 검정으로 통계 분석하고 각 그룹 간의 비교를 Student-Newman-Keuls 사후검정으로 분석하였을 때, 콩팥 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 각각 H=66.067, $N_{1\text{-}12}$=6, p=<0.001와 H=61.063, $N_{1\text{-}12}$=6, p=<0.001으로서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 그림 2B는 허혈-재관류와 sham 수술 이후 48시간에서 30 mg 용량의 머캅토에탄올 또는 vehicle을 투여한 생쥐의 콩팥 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층의 대표적인 조직학적 변화를 PAS 염색으로 보여 주었다(그림 2B). 위 결과들은 머캅토에탄올의 전처치가 허혈-재관류 손상으로 인한 콩팥 요세관의 조직학적 손상을 예방하고 있음을 말해준다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

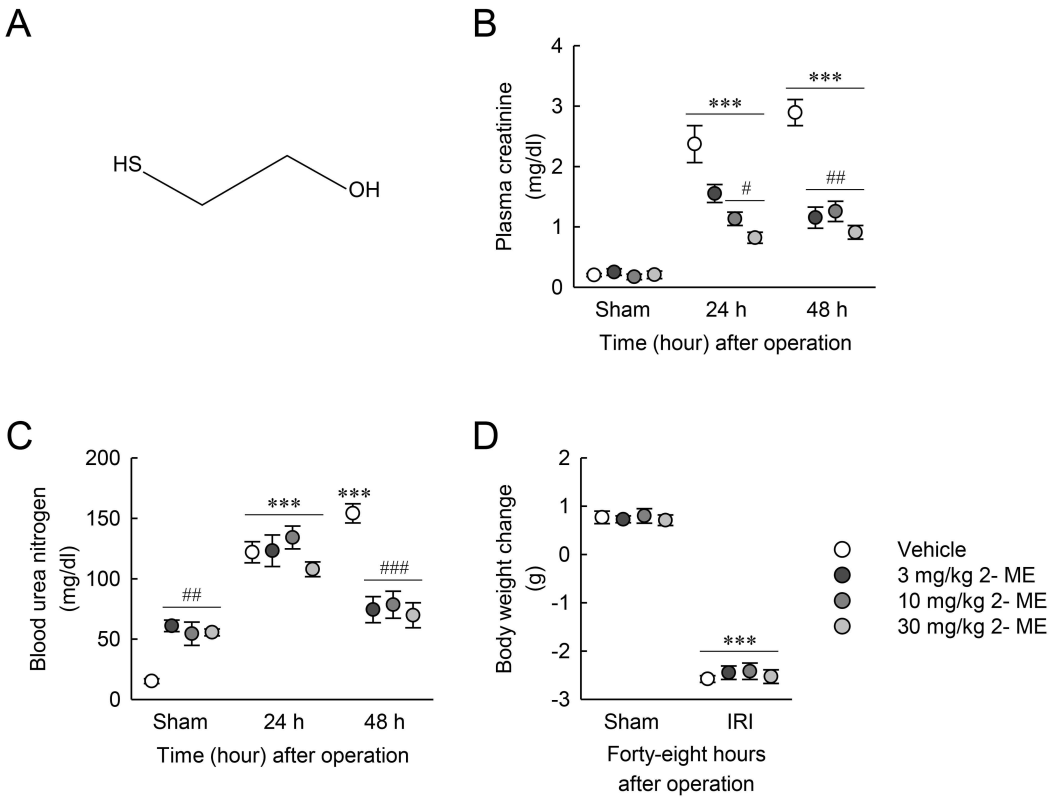


그림 1. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 기능 저하에 대한 머캅토에탄올의 보호 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 24시간 및 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 허혈-재관류 손상(IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 3, 10, 또는 30 mg을 복강으로 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) 머캅토에탄올의 골격 구조식. 머캅토에탄올의 화학식은 C_2H_6OS이다. (**B**, **C**) 혈장 creatinine 수치와 blood urea nitrogen 수치는 콩팥 기능의 지표로 사용되었다. (**D**) 체중 변화는 생쥐를 희생(sacrifice)시키기 전 4시간 때의 체중에서 수술 전 24시간 때의 체중을 뺀 값으로 나타냈다. (**B**-**D**) 모든 결과는 two-way ANOVA와 Tukey 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. ***, p<0.001 versus sham; #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.001 versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

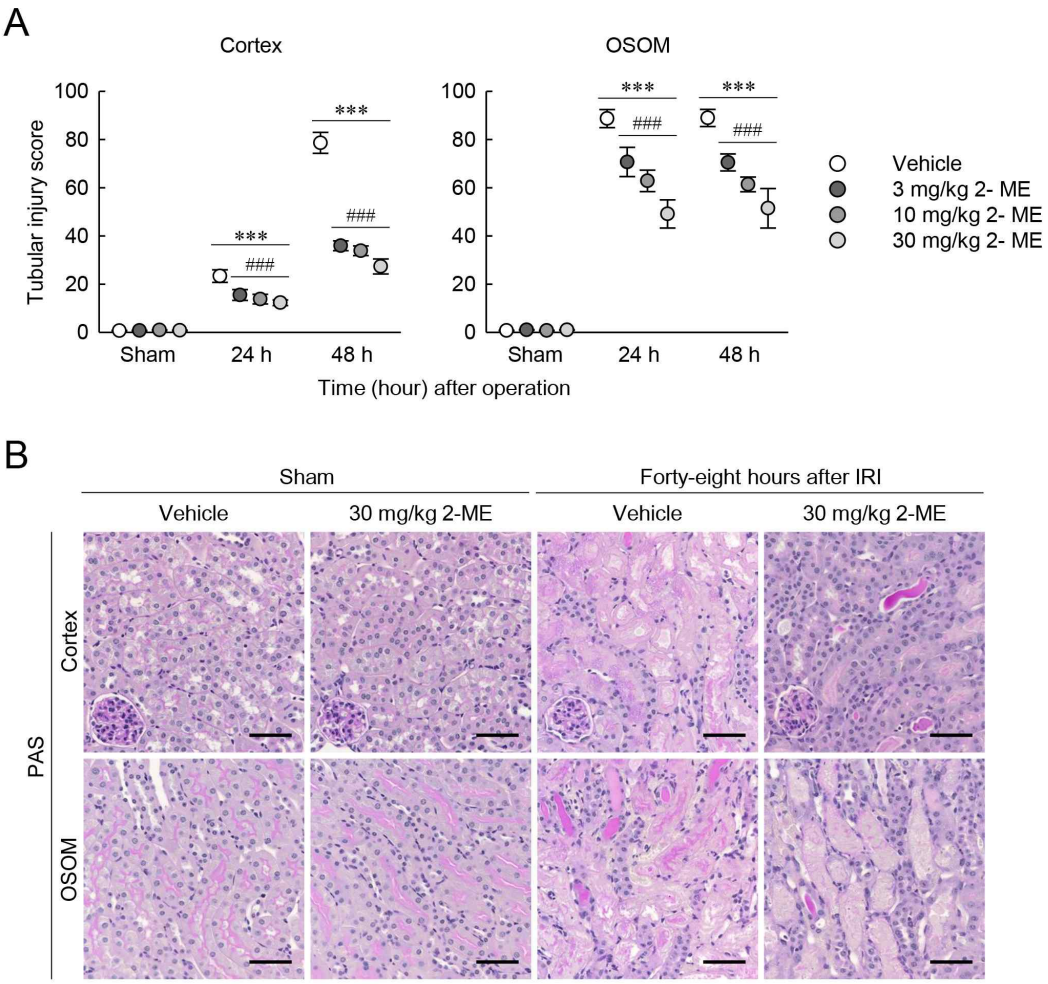


그림 2. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 요세관의 조직학적 손상에 대한 머캅토에탄올의 보호 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 24시간 및 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 허혈-재관류 손상(IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 3, 10, 또는 30 mg을 복강으로 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) 피질(cortex)과 바깥수질 바깥줄무늬층(outer stripe of the outer medulla, OSOM)의 요세관 손상 점수. (**B**) 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 PAS 염색으로 나타낸 대표적인 사진. Scale bar, 50 ㎛. ***, p<0.001 versus sham; ###, p<0.001 versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 머캅토에탄올의 후처치는 허혈-재관류 손상으로 인한 콩팥의 기능 저하와 조직학적 손상을 감소시킨다.

허혈-재관류 손상에 대한 머캅토에탄올의 치료적 효능을 알아보기 위해 콩팥 허혈-재관류 이후 6시간 또는 24시간 때 머캅토에탄올을 후처치(post-treatment)하여 콩팥 기능을 조사하였다. 허혈-재관류 손상이 48시간 동안 진행되었을 때, 혈장 creatinine 수치는 허혈-재관류 이후 6시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서 유의하게 감소되었지만, 24시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서는 유의한 차이가 없었다(그림 3A). 본 혈장 creatinine 수치 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 유의한 차이를 보였다($F_{2,15}$=13.4, p<0.001). 추가적으로, BUN 수치를 측정하였을 때, 혈장 creatinine 수치 결과와 유사하게 나왔다. 허혈-재관류 이후 6시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서는 유의한 감소를 보였지만, 24시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 3B). 본 BUN 수치 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때도 유의한 차이를 보였다($F_{2,15}$=2400.6, p=0.005). 이러한 결과들은 콩팥 허혈-재관류로 인해 급성콩팥손상이 발생하는 초기 단계에 머캅토에탄올을 투여하면 콩팥 기능 저하를 효과적으로 막을 수 있지만, 이미 손상이 진행되는 단계에서는 머캅토에탄올 투여의 효과가 없음을 보여 준다.

다음으로 머캅토에탄올의 후처치에서 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 조직학적 변화를 살펴보았을 때, 콩팥의 기능 결과와 유사하게, 허혈-재관류 이후 6시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층의 요세관 손상 점수가 현저하게 낮았다(그림 4A). 그러나 허혈-재관류 이후 24시간부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐에서는 요세관 손상 점수에 대한 유의한 차이가 없었다(그림 4A). 특히, 콩팥의 바깥수질 바깥줄무늬층 보다 피질 부위에서 머캅토에탄올 후처치에 의한 요세관의 구조적 손상이 상당히 억제되었다(그림 4A, B). 이는 허혈-재관류 손상이 빠르게 진행하는 바깥수질 바깥줄무늬층보다 점증적으로 손상이 진행되는 피질 부위에서 머캅토에탄올의 치료가 효과적으로 작용함을 말해준다. 그림 4B는 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 6시간 또는

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

24시간 후부터 머캅토에탄올을 후처치한 생쥐 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층 부위에서 PAS로 염색한 대표적인 현미경 사진을 보여주고 있다. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인해 요세관 위축, 요세관 속공간 내 원주 형성, 그리고 세포핵 손실이 허혈-재관류 손상 6시간 후부터 머캅토에탄올을 투여한 콩팥에서는 드물게 관찰되었다. 본 요세관 손상 점수 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 콩팥 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 각각 $F_{2,15}$=11.877, p<0.001와 $F_{2,15}$=4.647, p=0.027으로 나타남으로서 유의한 변화를 보였다. 위 결과들을 종합해보면, 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 진행되는 급성콩팥손상에 대한 머캅토에탄올의 초기 치료는 요세관의 조직학적 손상 진행을 효과적으로 막아준다는 사실을 알 수 있다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

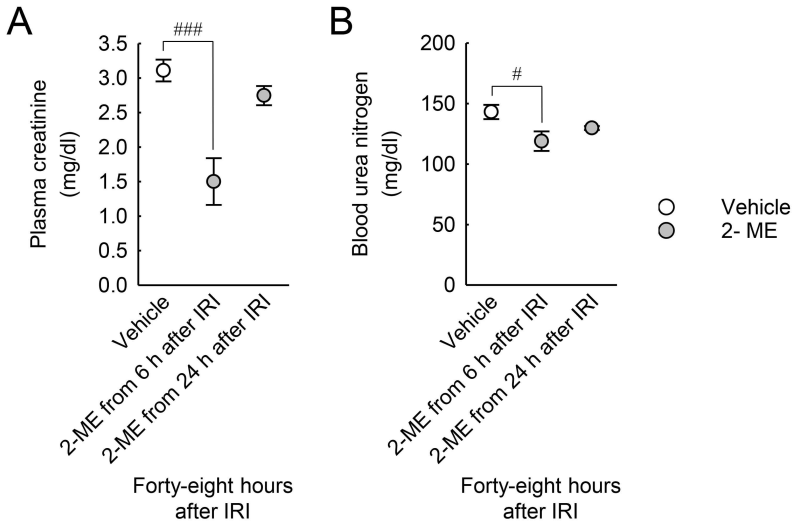


그림 3. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 기능 저하에 대한 머캅토에탄올의 치료 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfustion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 후 6시간 또는 24시간 후부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**, **B**) 혈장(plasma) creatinine 농도와 blood urea nitrogen(BUN) 농도는 콩팥 기능의 지표로 사용되었다. 모든 결과는 one-way analysis of variance(ANOVA)으로 통계 분석하였고, Tukey 사후(post hoc)검정으로 그룹 간의 차이를 분석하였다. 그래프는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. #, $p<0.05$; ###, $p<0.001$ versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

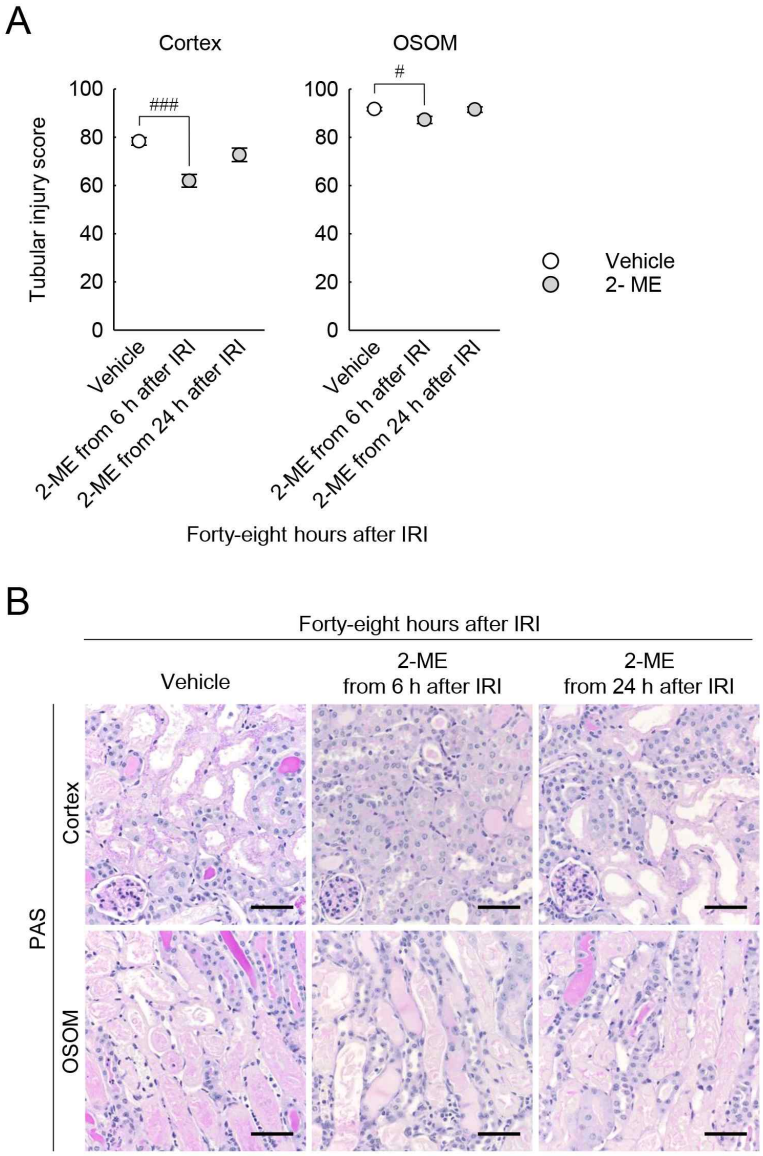


그림 4. 허혈-재관류 손상으로 유발된 콩팥 요세관의 조직학적 손상에 대한 머캅토에탄올의 치료 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfustion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 후 6시간 또는 24시간 후부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) 피질(cortex)과 바깥수질 바깥줄무늬층(outer stripe of the

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

outer medulla; OSOM)의 요세관 손상 점수(tubular injury score)는 periodic acid-Schiff(PAS)로 염색된 콩팥 절편 당 무작위로 선택된 5개의 400배 배율 시야에서 측정하였다. 요세관 손상 점수 데이터는 정규 분포(normal distribution)를 나타내기 때문에 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Tukey 사후(post hoc) 검정으로 통계 분석하였고, 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표현하였다. #, $p<0.05$; ###, $p<0.001$ versus vehicle. (**B**) Eclipse Ni 현미경과 DS-Ri2 카메라와 NIS Elements imaging 소프트웨어를 이용하여 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 PAS 염색으로 나타낸 대표적인 현미경 사진을 촬영하였다. Scale bar, 50 ㎛.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 머캅토에탄올은 허혈-재관류 손상으로 인한 요세관 상피세포의 DNA 이중가닥 절단을 막는다.

H2A.X variant histone 단백질 내 서열 139번 serine의 인산화(phosphrylation)를 통해 γH2AX가 생성되며, 이는 DNA 이중가닥 절단에 대한 세포의 초기 단계에 일어나는 반응으로서 DNA 이중가닥 절단의 직접적인 마커로 사용된다[37]. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유도된 DNA 이중가닥 절단에 대한 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 먼저 western blot 분석을 이용하여 콩팥 내 γH2AX 단백질의 전체 발현량을 측정하였다. 그 결과, 허혈-재관류 손상이 48시간 동안 진행되었을 때, γH2AX 발현이 크게 증가하였지만, 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서는 이러한 발현 증가가 현저하게 줄어들었다(그림 5A, B). 그리고 sham 수술을 시행한 콩팥에서의 γH2AX 발현은 머캅토에탄올 투여에 의한 유의한 차이를 나타내지 않았다(그림 5A, B). 콩팥 내 γH2AX 단백질 발현을 수치화한 결과를 two-way AMOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=47.962, p<0.001), 머캅토에탄올($F_{1,20}$=12.927, p=0.002), 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{1,20}$=11.755, p=0.003)에서 모두 유의한 차이를 보였다. 이는 머캅토에탄올이 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 DNA 이중가닥 절단을 효과적으로 억제함을 의미한다.

콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 DNA 이중가닥 절단이 발생하는 요세관에서 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 면역조직화학염색을 이용하여 γH2AX가 염색된 요세관 상피세포의 수를 측정하였다. 그림 6A는 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층의 요세관 상피세포에서 각각 염색된 γH2AX의 대표적인 사진을 보여주고 있다. 추가적으로 이중 면역형광염색(double immunofluorescent stain)을 이용하여 γH2AX가 발현하는 요세관의 종류를 관찰하였다. AQP1을 발현하는 근위요세관[38]과 NKCC2를 발현하는 헨레고리의 굵은오름다리(thick ascending limb) 및 원위요세관[39,40]의 상피세포 내 세포핵에서 γH2AX 발현이 주로 관찰되었다(그림 6B). γH2AX가 염색된 요세관 상피세포의 수는 콩팥 허혈-재관류 손상이 48시간 동안 진행되었을 때, γH2AX가 염색된 세포의 수가 콩팥의

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 크게 증가하였다(그림 6A, C). 특히, 피질 부위와 비교하였을 때, 바깥수질 바깥줄무늬층 부위에서 γH2AX의 염색이 더 많이 관찰되었다(그림 6A, C). 이를 통해, 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 바깥수질 바깥줄무늬층이 요세관 손상에 가장 취약한 부위인 것처럼 DNA 이중가닥 절단도 가장 빈번하게 발생하는 부위임을 알 수 있다. 그러나 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서는 이렇게 γH2AX가 염색된 세포의 수가 현저하게 적게 관찰되었다(그림 6A, C). 본 γH2AX가 염색된 요세관 상피세포의 수를 Kruskal-Wallis 검정으로 통계 분석하였고 각 그룹 간의 차이는 Student-Newman-Keuls 사후검정으로 분석하였다. 콩팥 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 각각 H=19.391, N_{1-4}=6, p=<0.001과 H=19.925, N_{1-4}=6, p=<0.001으로서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과들은 허혈-재관류 손상에서 머캅토에탄올에 의한 DNA 이중가닥 절단의 억제 효과가 콩팥 요세관 상피세포에서 나타남을 제시한다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

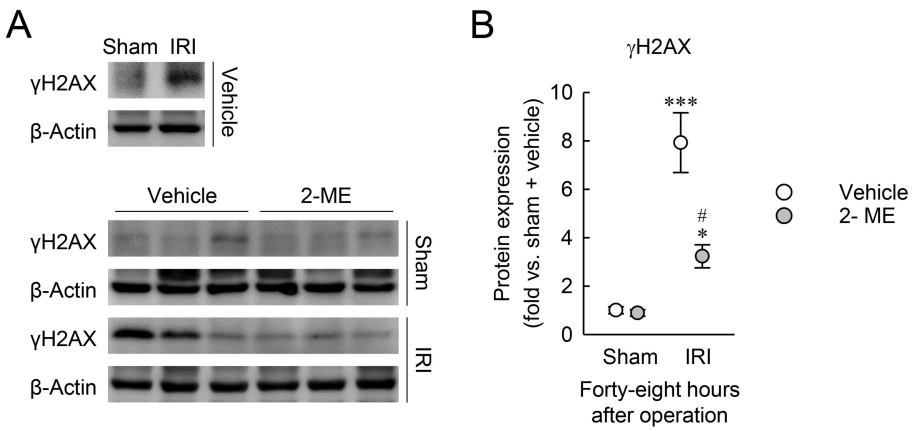


그림 5. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 γH2AX의 발현 증가에 대한 머캅토에탄올의 억제 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량만큼 복강으로 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) 콩팥 내 H2A.X variant histone phosphorylated at serine 139(γH2AX)의 발현을 보여주는 western blot의 대표적인 결과. Anti-β-actin 항체는 동일한 단백질 용량으로 western blot 실험이 진행되었음을 보여준다. (**B**) AzureSpot 분석 소프트웨어(Azure Biosystems 회사)를 사용하여 콩팥 내 γH2AX의 발현을 수치화하였다. 본 결과는 정규 분포(normal distribution)를 나타냄으로서 two-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계 분석하였고 Tukey 사후(post hoc)검정으로 그룹 간의 차이를 분석하였다. 그래프는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. *, $p<0.05$; ***, $p<0.001$ versus sham; #, $p<0.05$ versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

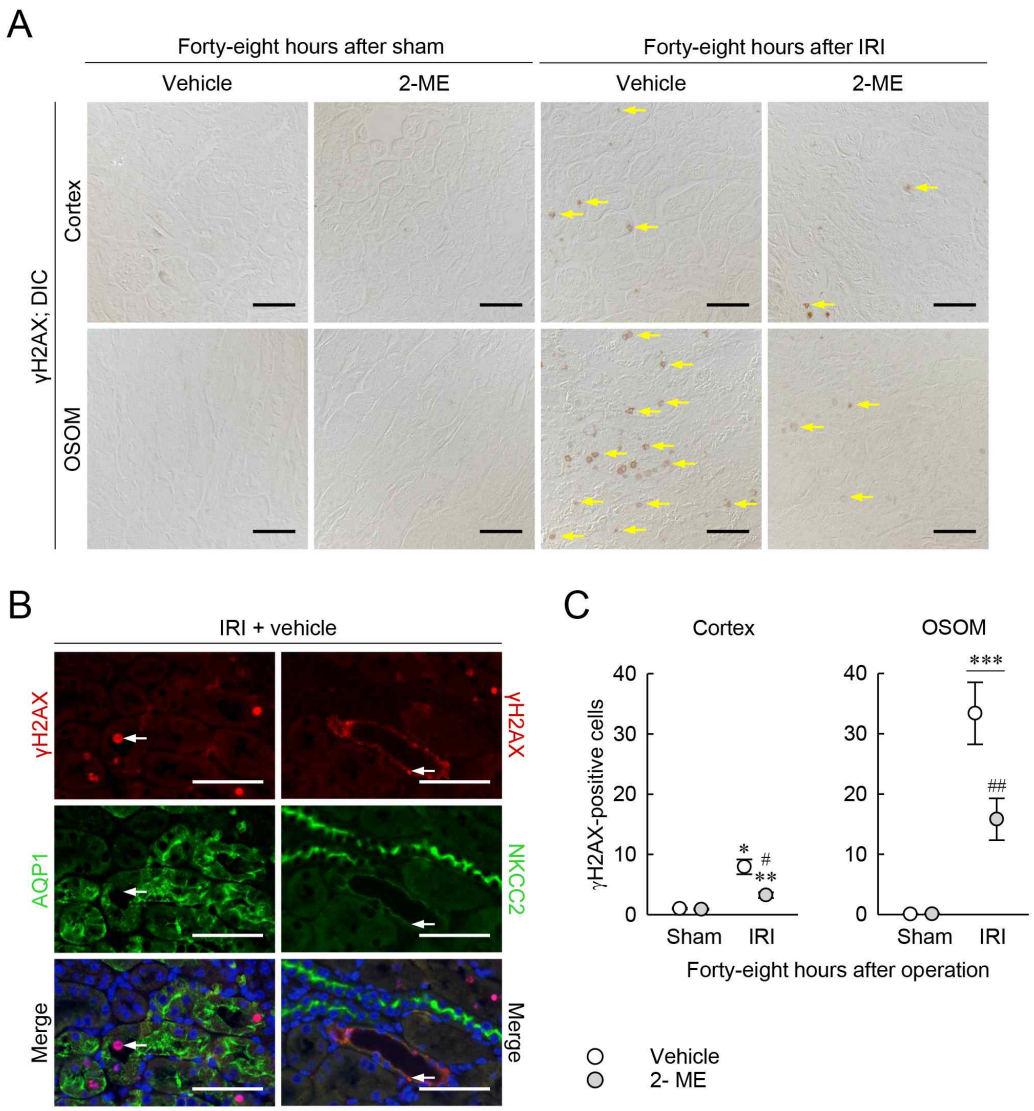


그림 6. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 γH2AX가 발현하는 세포 수 증가에 대한 머캅토에탄올의 억제 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) Eclipse Ni 현미경과 DS-Ri2 카메라와 NIS Elements imaging 소프트웨어를 이용하여 콩팥의 피질(cortex)과 바깥수질 바깥줄무늬층

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(outer stripe of the outer medulla, OSOM)에서 발현하는 H2A.X variant histone phosphorylated at serine 139(γH2AX)의 대표적인 사진을 보여준다. 면역조직화학염색(immuohistochemical stain) 방법을 사용하였다. 노란색 화살표는 γH2AX가 염색된 요세관 상피세포를 가리킨다. (**B**) 허혈-재관류로 손상된 콩팥 절편에서 γH2AX 항체와 aquaporin 1(AQP1) 항체 및 Na-K-Cl cotransporter 2(NKCC2) 항체를 이용하여 이중 면역형광염색(double immunofluorescent stain)을 실시하였고, 이들을 형광현미경으로 관찰하였다. 하얀색 화살표는 AQP1이 발현하는 근위요세관(proximal tubule)과 NKCC2가 발현하는 원위요세관(distal tubule)에서 관찰되는 대표적인 γH2AX 발현을 가리킨다. (**A**, **B**) Scale bar, 50 ㎛. (**C**) 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 γH2AX가 염색된 세포의 수는 400배 배율 시야에서 계산되었다. 본 결과는 정규 분포(normal distribution)를 나타내지 않기 때문에 비모수 검정(nonparametric test) 중 Kruskal-Wallis 검정으로 통계 분석하였고 Student-Newman-Keuls 사후(post hoc)검정으로 그룹 간의 차이를 분석하였다. 모든 결과는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표현하였다. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ versus sham; #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$ versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올은 ATM 신호전달경로의 활성을 유도한다.

DNA 이중가닥 절단에 대한 반응으로 DNA 복구와 관련된 특별한 신호전달 단백질들이 활성 되는데[41], 다음으로는 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올에 의해 활성이 일어나는 DNA 손상 반응 관련 신호전달경로는 무엇인지 알아보기 위해, western blot 분석을 이용하여 관련 단백질들의 인산화를 조사하였다. DNA 손상 반응에 작용하는 단백질 중 초기 단계에서 작용하는 upstream sensor kinase인 ATM와 ATR의 인산화를 측정하였을 때, 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 48시간에서 ATM과 ATR의 인산화가 모두 두드러지게 증가하였다(그림 7A, B). 그리고 머캅토에탄올의 투여는 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 ATM의 인산화를 더욱 증가시켰다(그림 7A, B). 그러나 허혈-재관류로 손상받은 콩팥에서 증가된 ATR의 인산화는 머캅토에탄올에 의한 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과는 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올이 DNA 손상 반응의 초기 단계에 반응하는 단백질 중 ATM의 활성을 선택적으로 더욱 높인다는 것을 보여준다. 즉, 머캅토에탄올이 ATM의 DNA 손상 반응을 더욱 활성 시킴으로서 허혈-재관류 손상으로 인한 DNA 이중가닥 절단을 보호한다고 제시할 수 있다. ATM 인산화의 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=39.460, p<0.001)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{1,20}$=6.207, p=0.022)에서는 유의한 차이를 보였지만, 머캅토에탄올($F_{1,20}$=3.496, p=0.076)에서는 차이가 없었다. 그리고 ATR 인산화의 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=69.138, p<0.001)에서만 유의한 차이가 보였고 머캅토에탄올($F_{1,20}$=1.077, p=0.312)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 간의 상호작용($F_{1,20}$=0.0453, p=0.834)에서는 차이가 없었다.

다음으로 ATM 신호전달경로에서 downstream effector kinase로 작용하는 단백질들의 인산화를 western blot 분석을 이용하여 측정하였다. 허혈-재관류 손상 이후 48시간이 경과된 콩팥에서 downstream effector kinase 중 Chk1, Chk2, XRCC1의 인산화는 감소하였지만, 이들 모두 머캅토에탄올을 투여받은 생쥐의 콩

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

팥에서는 vehicle을 투여받은 생쥐의 콩팥보다 유의하게 높았다(그림 7A, C). 그리고 sham 수술을 받은 콩팥에서 이들 Chk1, Chk2, XRCC1의 인산화는 머캅토에탄올 투여와 vehicle 투여 사이에 유의한 차이가 없었다(그림 7A, C). Chk1 인산화에 대한 two-way ANOVA의 통계 분석은 허혈-재관류 ($F_{1,20}$=4.702, p<0.042)에서 유의한 차이를 보여주었지만, 머캅토에탄올($F_{1,20}$=3.527, p=0.075)에서는 차이가 없었다. 그리고 Chk2 인산화에 대한 two-way ANOVA의 통계 분석은 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=5.618, p=0.028), 머캅토에탄올($F_{1,20}$=9.727, p=0.005), 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=4.692, p=0.043) 모두 유의한 차이를 나타냈다. 마지막으로 XRCC1 인산화에 대한 two-way ANOVA의 통계 분석은 머캅토에탄올($F_{1,20}$=10.703, p=0.004)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=4.514, p=0.046)에서 유의한 차이를 나타냈지만, 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=1.075, p=0.312)에서는 차이가 없었다. 이러한 결과들은 머캅토에탄올이 허혈-재관류 손상 후 ATM 관련 신호전달경로를 통해 DNA 손상 반응을 일으킴을 알 수 있다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

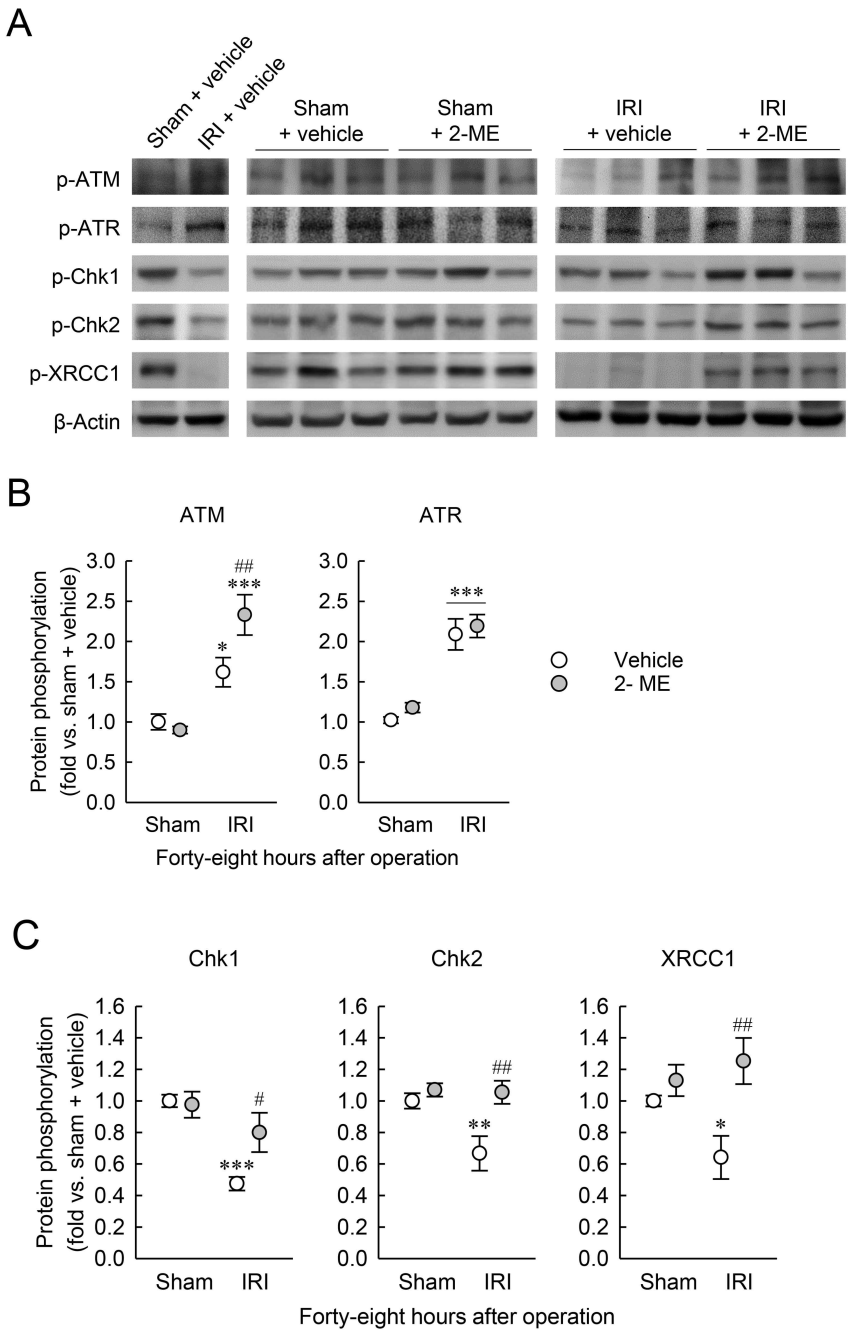


그림 7. 허혈-재관류 손상 받은 콩팥에서 머캅토에탄올에 의한 ATM 신호전달경로의 활성

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

injury, IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강으로 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) Ataxia telangiectasia mutated(ATM), ataxia telangiectasia and Rad3 related(ATR), checkpoint kinase 1(Chk1), checkpoint kinase 2(Chk2), X-ray repair cross-complementing protein 1(XRCC1)의 인산화(phosphorylation)를 측정하기 위해 western blot 분석을 실시하였다. β-Actin의 발현은 동일한 용량의 단백질을 사용하였음을 보여준다. (**B**) ATM과 ATR 단백질의 인산화를 수치화하였다. (**C**) Chk1, Chk2, 그리고 XRCC1 단백질의 인산화를 수치화하였다. (**B**, **C**) 단백질 인산화를 수치화하기 위해 AzureSpot 분석 소프트웨어(Azure Biosystems 회사)를 사용하였다. 모든 결과는 정규 분포(normal distribution)를 나타내기 때문에, two-way analysis of variance(ANOVA)로 통계 분석하였고 Tukey 사후(post hoc)검정으로 그룹 간의 차이를 분석하였다. 모든 그래프는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. ∗, p<0.05; ∗∗, p<0.01; ∗∗∗, p<0.001 versus sham; #, p<0.05; ##, p<0.01 versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올은 GPX4 항산화 단백질을 선택적으로 과발현 시킨다.

산화 스트레스(oxidative stress)는 DNA 이중가닥 절단의 중요한 원인[42]이며 허혈-재관류 손상의 핵심 제공자이다[43]. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 산화 스트레스에서 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 western blot 분석을 이용하여 콩팥 내 항산화 단백질들의 전체 발현량을 측정하였다. 그 결과, 허혈-재관류 손상이 48시간 동안 진행되었을 때, GPX4, catalase, CuZnSOD 그리고 MnSOD의 단백질 발현이 모두 유의하게 감소하였다. 그러나 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서 GPX4 단백질의 발현만 현저하게 증가하였다(그림 8A, B). 그리고 sham 수술을 시행한 콩팥에서 항산화 단백질들의 발현은 머캅토에탄올 투여에 의한 유의한 차이를 나타내지 않았다(그림 8A, B). GPX4의 발현 결과를 two-way ANOVA를 이용하여 통계 분석하면 머캅토에탄올($F_{1,20}$=11.763, p=0.003)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=17.306, p<0.001)에서는 유의한 차이를 나타냈지만, 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=0.0204, p=0.888)에서는 차이가 없었다. Catalase의 발현 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하면 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=32.415, p<0.001)에서 유의한 차이를 나타냈지만, 머캅토에탄올($F_{1,20}$=1.247, p=0.277)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=0.244, p=0.626)에서는 유의한 차이가 없었다. CuZnSOD의 발현 결과를 two-way ANOVA의 통계 분석은 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=40.121, p<0.001)에서 유의한 차이를 나타냈지만 머캅토에탄올($F_{1,20}$=1.317, p=0.265)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=0.444, p=0.513)에서는 차이가 없었다. MnSOD의 발현 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하면 허혈-재관류 손상($F_{1,20}$=52.641, p<0.001)에서 유의한 차이를 나타냈고 반대로 머캅토에탄올($F_{1,20}$=1.352, p=0.259)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{1,20}$=0.0346, p=0.854)에서는 차이가 없었다. 이는 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올이 GPX4 단백질의 발현을 선택적으로 과발현 시킴을 시사한다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

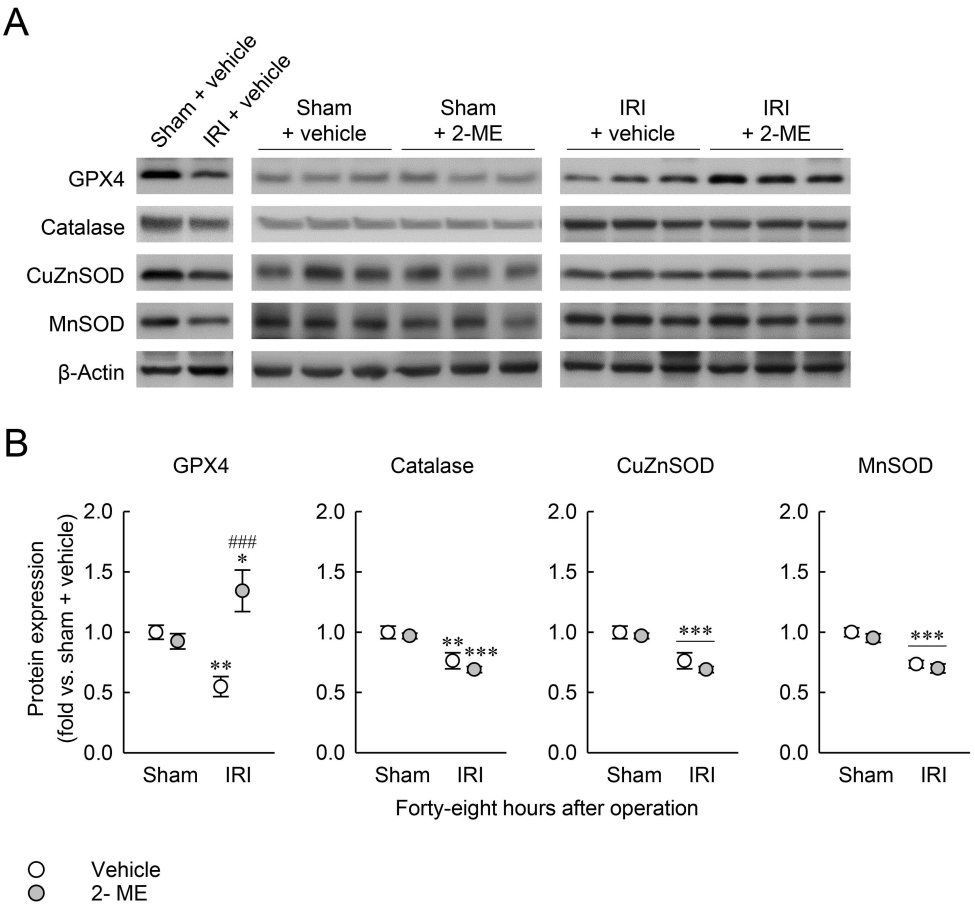


그림 8. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 GPX4 발현 감소에 대한 머캅토에탄의 억제 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 유도하기 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) Glutathione peroxidase 4(GPX4), catalase, copper-zinc superoxide dismutase(CuZnSOD), manganese superoxide dismutase(MnSOD) 단백질의 발현을 western blot으로 나타내었다. β-Actin 항체는 동일한 단백질 정량을 나타내기 위해 사용되었다. (**B**) GPX4, catalase, CuZnSOD, MnSOD의 발현을 수치화하였다. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ versus sham; ###, $p<0.001$ versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

6. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올은 ferroptosis에 영향을 주지 않는다.

Ferroptosis는 환원된(reduced) glutathione(GSH)의 감소로 인해 유발되어 지질과산화(lipid peroxidation)의 축적으로 이어지는 세포사이다[44,45]. ferroptosis는 허혈-재관류 손상의 발생과 진행에 관여한다는 보고가 있다[46,47]. 다음으로, 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 ferroptosis에 대한 머캅토에탄올의 효과를 알아보기 위해 western blot 분석을 이용하여 ferroptosis 관련 단백질로 알려진 SLC7A11 단백질의 발현을 측정하였다. 콩팥 허혈-재관류가 24시간과 48시간 동안 진행되었을 때, SLC7A11 단백질의 발현이 유의하게 감소하였다(그림 9A, B). 그리고 수술 이전 24시간부터 머캅토에탄올을 농도별로 투여하였을 때 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥과 sham 수술한 콩팥 모두에서 유의한 차이가 없었다. SLC7A11 단백질의 발현 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때 허혈-재관류 손상($F_{2,60}$=47.065, p<0.001)에서는 유의한 차이를 나타냈지만 머캅토에탄올($F_{2,60}$=1.512, p=0.220)과 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{2,60}$=0.577, p=0.747)에서는 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 머캅토에탄올이 허혈-재관류 손상에서 SLC7A11 단백질의 변화에 영향을 미치지 않는다는 사실을 보여 준다. 즉, 머캅토에탄올이 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 ferroptosis에 영향을 미치지 않음을 시사한다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

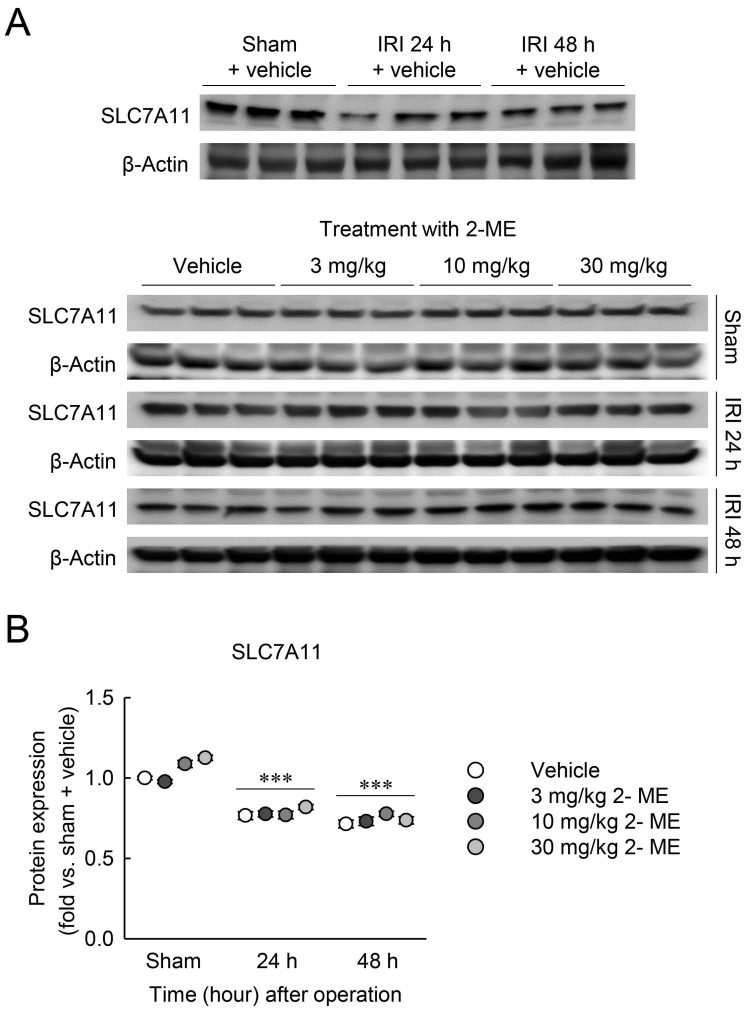


그림 9. 허혈-재관류 손상 후 머캅토에탄올에 의한 SLC7A11 발현 변화

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 24시간 및 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 허혈-재관류 손상(IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 3, 10, 또는 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그룹 당 6마리. (**A**) Solute carrier family 7 member 11(SLC7A11)의 발현을 western blot 분석으로 측정하였다. Anti-β-actin 항체는 단백질 정량 확인을 위해 사용되었다. (**B**) SLC7A11 발현을 수치화하였다. 본 결과는 정규 분포(normal distribution)를 나타내지 않아 Kruskal-Wallis 검정과 Student-Newman-Keuls 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. ***, p<0.001 versus sham.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

7. GPX4 억제는 허혈-재관류 손상 동안 머캅토에탄올에 의한 DNA 손상의 보호 효과를 상쇄 시킨다.

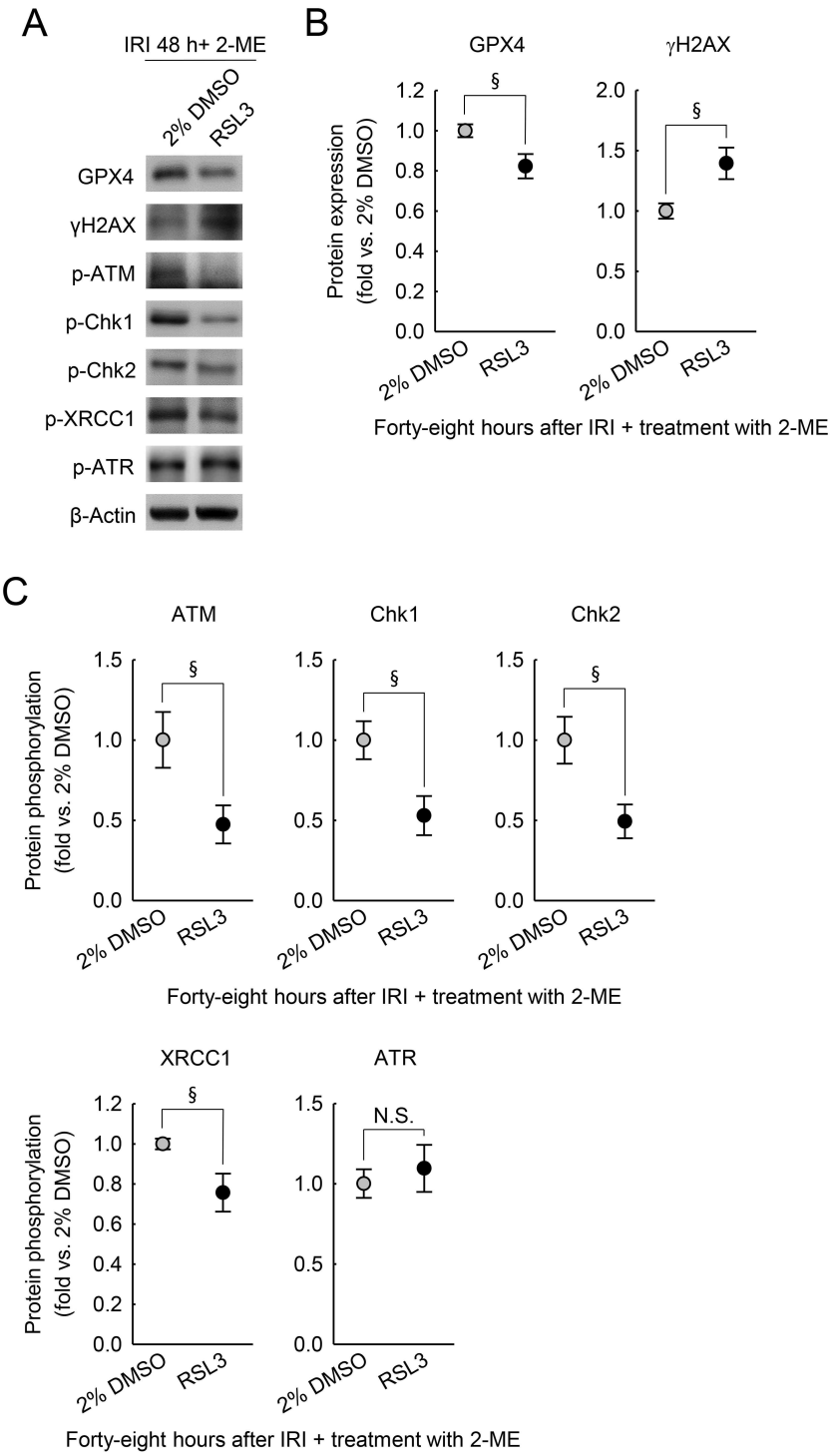
GPX4는 지질과산화를 감소시킬 뿐만 아니라 nucleoside 중 thymidine의 과산화(peroxidation) 작용도 억제한다[48]. 콩팥 허혈-재관류 손상에서 머캅토에탄올에 의한 GPX4의 과발현이 DNA 손상에 대한 보호 효과와 관련 있는지 알아보기 위해, 머캅토에탄올을 전처치하고 콩팥 허혈-재관류 손상을 받은 생쥐에서 RSL3라는 GPX4 억제제(inhibitor)를 이용하였다. 먼저, GPX4 발현을 조사하였을 때, 콩팥 허혈-재관류 손상 48시간 이후, RSL3와 머캅토에탄올을 같이 투여받은 생쥐의 콩팥은 머캅토에탄올만 단독으로 투여받은 생쥐의 콩팥보다 GPX4 단백질의 발현이 상당히 억제되었다(그림 10A, B). GPX4 단백질의 발현 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, $F_{1,10}$=6.606, p=0.028으로 나타남으로서 그룹별로 유의한 차이를 보였다. 이는 RSL3 투여가 GPX4의 발현을 효과적으로 억제하였음을 알 수 있다. 다음으로는 γH2AX의 발현을 조사함으로서 DNA 이중가닥 절단 정도를 조사하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상 48시간 이후, RSL3와 머캅토에탄올을 동시에 투여받은 생쥐의 콩팥은 머캅토에탄올만 단독으로 투여받은 생쥐의 콩팥보다 γH2AX의 발현이 현저하게 증가하였다(그림 10A, B). 본 γH2AX 단백질의 발현 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, $F_{1,10}$=7.411, p=0.021으로 나타남으로서 그룹별로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과를 통해 머캅토에탄올에 의해 억제되었던 DNA 이중가닥 절단이 GPX4 억제를 통해 다시 유발되었음을 보여준다. 즉 GPX4 발현의 억제가 허혈-재관류 손상 동안 머캅토에탄올에 의한 DNA 손상에 대한 보호 효과를 상쇄시킴을 시사한다.

다음으로는 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올에 의해 유도된 ATM 신호전달경로의 활성과 관련하여 GPX4 억제 효과를 살펴보기 위해, western blot 분석을 이용하여 upstream sensor kinase 단백질들의 인산화를 측정하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상 48시간 이후, RSL3와 머캅토에탄올를 동시에 투여받은 생쥐의 콩팥에서는 머캅토에탄올을 단독으로 투여받은 생쥐의 콩팥보다 ATM 단백질의 인산화가 현저하게 감소하였지만, ATR 단백질의 인산화는 차

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

이가 없었다(그림 10A, C). ATM 인산화에 대한 one-way ANOVA의 통계 분석은 $F_{1,10}$=6.278, p=0.031으로 그룹별로 유의한 차이를 보였다. 그러나 ATR에 대한 one-way ANOVA의 통계 분석은 $F_{1,10}$=0.307, p=0.592으로 그룹별로 차이가 없었다. 이 결과를 통해, 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 GPX4 억제는 DNA 손상 초기에 반응하는 단백질 중 ATM의 활성을 유의하게 감소시킨다는 것을 알 수 있다. 즉, GPX4 억제가 ATM 관련 DNA 손상 반응을 감소시킴으로써 머캅토에탄올에 의한 DNA 이중가닥 절단의 보호 효과를 상쇄시킴을 보여주고 있다. 다음으로 ATM 신호전달경로에서 downstream effector kinase로 작용하는 단백질들의 인산화를 측정하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 48시간 동안 진행된 콩팥에서 RSL3와 머캅토에탄올을 함께 투여받은 생쥐의 콩팥은 머캅토에탄올만 투여받은 생쥐의 콩팥과 비교하여 Chk1, Chk2, XRCC1의 인산화가 모두 현저하게 감소하였다(그림 10A, C). 이들 인산화 결과들을 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, Chk1과 Chk2, XRCC1에서 각각 $F_{1,10}$=7.665, p=0.020와 $F_{1,10}$=7.977, p=0.018 그리고 $F_{1,10}$=6.056, p=0.034으로 나타남으로서 그룹별로 유의한 차이를 보였다. 이상의 결과들은 콩팥 허혈-재관류 손상 후 머캅토에탄올에 의한 ATM 관련 DNA 손상 반응의 활성이 GPX4 과발현과 연관되어 있음을 시사한다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그림 10. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 DNA 보호에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI) 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그리고 2% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 함유한 0.9% 식염수에 Ras-selective lethal 3(RSL3)를 용해시켜 몸무게 kg 당 10 mg 용량으로 함께 복강 투여하였다. (**A**) Glutathione peroxidase 4(GPX4), H2A.X variant histone phosphorylated at serine 139(γH2AX), phospho-ataxia telangiectasia mutated(p-ATM), phospho-checkpoint kinase 1(p-Chk1), phospho-checkpoint kinase 2(p-Chk2), phospho-X-ray repair cross-complementing protein 1(p-XRCC1), phospho-ataxia telangiectasia and Rad3 related(p-ATR)를 western blot 분석 방법으로 확인하였다. 그리고 Anti-β-actin 항체는 동일한 단백질 정량을 보여주기 위해 사용되었다. (**B, C**) AzureSpot 분석 소프트웨어(Azure Biosystems 회사)를 이용하여 GPX4, γH2AX, p-ATM, p-Chk1, p-Chk2, p-XRCC1, p-ATR의 활성 및 발현을 수치화하였다. 모든 결과들은 정규 분포(normal distribution)를 나타내기 때문에 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Tukey 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였고, 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. §, $p<0.05$ versus 2% DMSO.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

8. GPX4 억제는 허혈-재관류 손상 동안 머캅토에탄올에 의한 콩팥 기능 저하와 요세관 손상의 보호 효과를 상쇄 시킨다.

다음으로 머캅토에탄올을 투여받은 생쥐의 콩팥에서 허혈-재관류 손상 이후 GPX4 억제제가 콩팥의 기능에 어떻게 영향을 미치는지 조사하였다. RSL3와 머캅토에탄올을 동시에 투여받은 생쥐를 머캅토에탄올만 투여받은 생쥐와 비교하였을 때, 혈장 creatinine 수치가 훨씬 더 높게 증가하였다(그림 11A). 혈장 creatinine 수치 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, $F_{1,10}$=32.808, p<0.001으로 나타남으로서 그룹 간에 유의한 차이를 보였다. 추가적으로 BUN 수치를 측정하였을 때도 콩팥 허혈-재관류 손상 동안 RSL3와 머캅토에탄올을 동시에 투여받은 생쥐의 BUN 수치가 유의하게 증가하였다(그림 11B). BUN 수치 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, $F_{1,10}$=30.665, p<0.001으로 나타남으로서 그룹 간에 유의한 차이를 보였다. 이상의 콩팥 기능 결과들을 종합해보면, 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥이 머캅토에탄올에 의해 콩팥 기능이 보호되었지만, GPX4 억제에 의해 그 보호 효과가 상쇄되었음을 알 수 있다.

다음으로 머캅토에탄올을 투여받은 생쥐의 콩팥에서 허혈-재관류 손상 이후 GPX4 억제에 의한 구조적 손상 변화를 관찰하였다. 콩팥 기능 결과와 유사하게, 콩팥 허혈-재관류 손상 동안 RSL3와 머캅토에탄올을 동시에 투여받은 생쥐의 콩팥과 머캅토에탄올을 단독으로 투여받은 생쥐의 콩팥을 비교하였을 때 콩팥의 수질과 바깥수질 바깥줄무늬층에 존재하는 요세관에서 심각한 손상이 유발되었다(그림 12A). 그림 12B처럼, 손상을 유도하기 24시간 전부터 머캅토에탄올과 RSL3를 동시에 투여받은 콩팥의 요세관에서 요세관 위축과 요세관 속공간의 원주가 다시 형성되는 것을 관찰하였다. 요세관 손상 점수 결과를 one-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 콩팥 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 각각 $F_{1,10}$=18.476, p<0.001와 $F_{1,10}$=4.969, p=0.022으로 나타남으로서 그룹 간에 유의한 차이를 보였다. 위 결과들을 종합해보면, GPX4의 억제가 머캅토에탄올을 투여받은 생쥐의 콩팥에서 나타나는 허혈-재관류 손상에 대한 보호 효과를 감소시키고 다시 요세관 손상을 유발시킴을 알 수 있다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

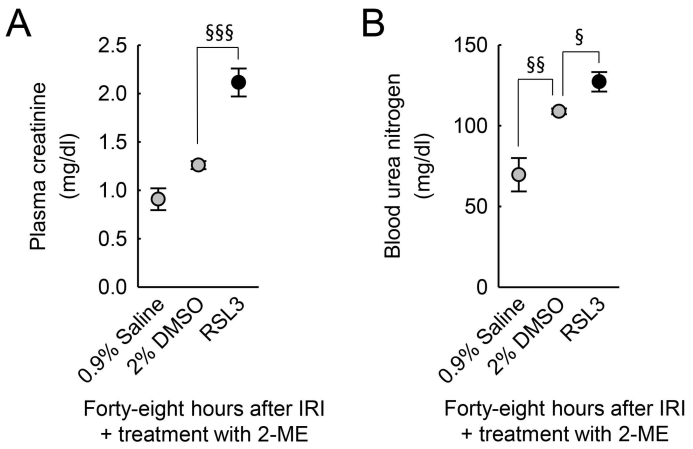


그림 11. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 콩팥 기능 보호에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion, IRI)을 유도하기 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그리고 2% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 함유한 0.9% 식염수에 용해된 Ras-selective lethal 3(RSL3)를 몸무게 kg 당 10 mg 용량으로 복강 투여하였다. (**A**, **B**) 혈장 creatinine 수치와 blood urea nitrogen 수치는 콩팥 기능의 지표로 사용되었다. 각각 30 ㎕과 5 ㎕의 혈장을 가지고 분석 키트를 이용하여 측정하였다. (**A**) 혈장 creatinine 수치는 정규 분포(normal distribution)를 나타내기 때문에 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Tukey 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. (**B**) Blood urea nitrogen 수치는 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Dunnett's 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였다. §, $p<0.05$; §§, $p<0.01$; §§§, $p<0.001$ versus 2% DMSO.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

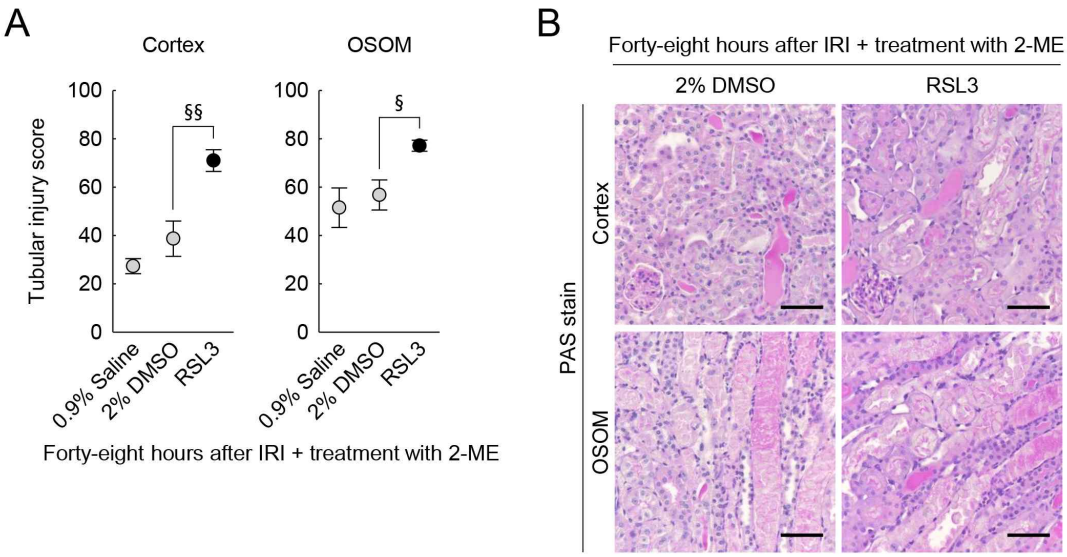


그림 12. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올의 조직학적 요세관 손상에 대한 GPX4 억제제의 상쇄 효과

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion, IRI)을 유도하기 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg 당 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. 그리고 2% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 함유한 0.9% 식염수에 용해된 Ras-selective lethal 3(RSL3)를 몸무게 kg 당 10 mg 용량으로 복강 투여하였다. (**A**) 피질(cortex) 및 바깥수질 바깥줄무늬층(outer stripe of the outer medulla; OSOM)에 위치하는 요세관 손상 점수(tubular injury score)는 periodic acid-Schiff(PAS)로 염색된 콩팥 절편에서 측정되었다. (**B**) Nikon Eclipse Ni 현미경과 DS-Ri2 카메라, 그리고 NIS Elements imaging 소프트웨어를 이용하여 콩팥의 피질과 바깥수질 바깥줄무늬층에서 PAS 염색으로 나타낸 대표적인 현미경 사진을 촬영하였다. Scale bar, 50 ㎛. §, p<0.05; §§, p<0.01 vs 2% DMSO.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

9. 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올이 p38, ERK, AKT의 활성을 유도한다.

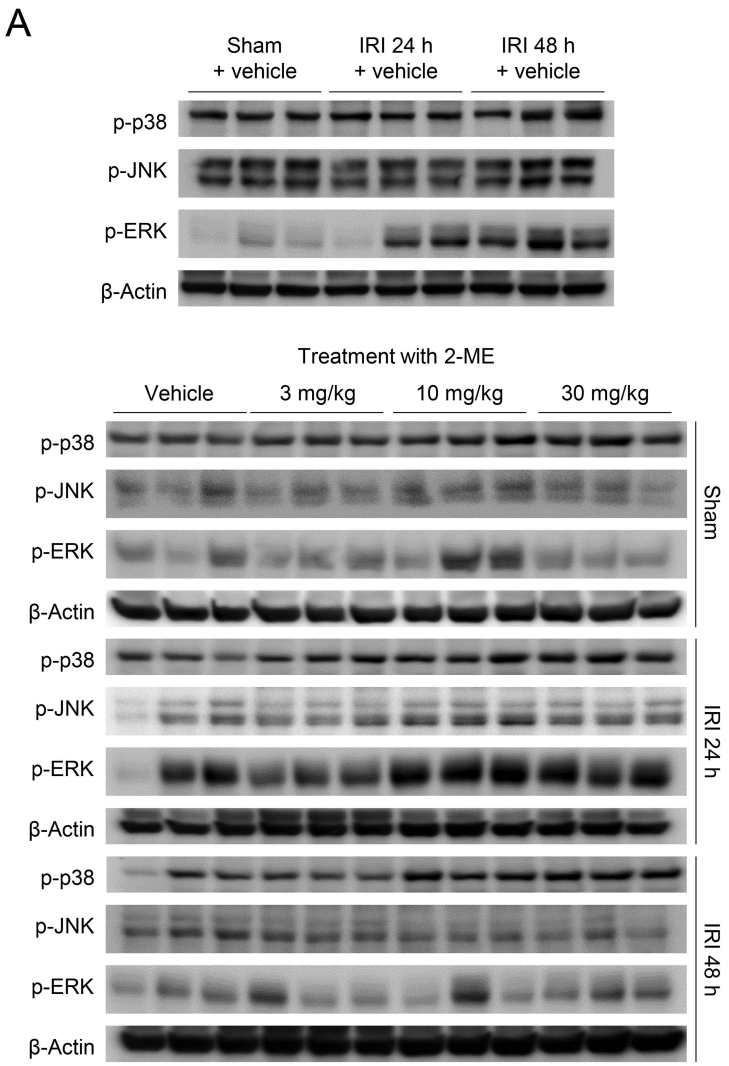
콩팥 허혈-재관류 손상으로 생성된 활성산소종이 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 유도한다는 보고는 잘 알려져 있다[49]. 그리고 이 MAPK는 GPX4를 포함한 다양한 유전자들의 발현을 조절한다[50,51]. 본 실험에서는 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 MAPK 활성에 대한 머캅토에탄올의 역할을 알아보기 위해, western blot 분석을 이용하여 관련 단백질들의 인산화를 조사하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상은 시간에 따라 p38과 ERK의 인산화를 두드러지게 증가시켰으나 JNK의 인산화에서는 유의한 차이가 없었다(그림 13A, B). 그리고 손상 24시간 전부터 머캅토에탄올을 투여받은 생쥐의 콩팥에서는 p38과 ERK의 인산화가 유의하게 더욱 증가하였고, JNK의 인산화는 머캅토에탄올 투여에 의한 유의한 차이를 나타내지 않았다(그림 13A, B). Sham 수술을 시행한 콩팥에서 p38과 ERK의 인산화는 머캅토에탄올에 의해 유의한 차이를 나타내지 않았다(그림 13A, B). p38 인산화에 대한 결과를 two-way ANOVA로 통계 분석하였을 때, 허혈-재관류 손상 ($F_{2,60}$=24.454, p<0.001), 머캅토에탄올($F_{2,60}$=38.407, p<0.001), 허혈-재관류 손상과 머캅토에탄올 사이의 상호작용($F_{2,60}$=2.736, p=0.020) 모두 유의한 차이를 나타냈다. JNK의 인산화 결과를 Kruskal-Wallis 검정과 Student-Newman-Keuls 사후검정으로 통계 분석하였을 때, H=10.151, N_{1-12}=6, p=0.517으로서 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 마지막으로 ERK의 인산화 결과를 Kruskal-Wallis 검정과 Student-Newman-Keuls 사후검정으로 통계 분석하였을 때, H=51.727, N_{1-12}=6, p<0.001로서 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과들은 콩팥 허혈-재관류 손상 후 머캅토에탄올에 의한 MAPK 활성 증가를 보여준다.

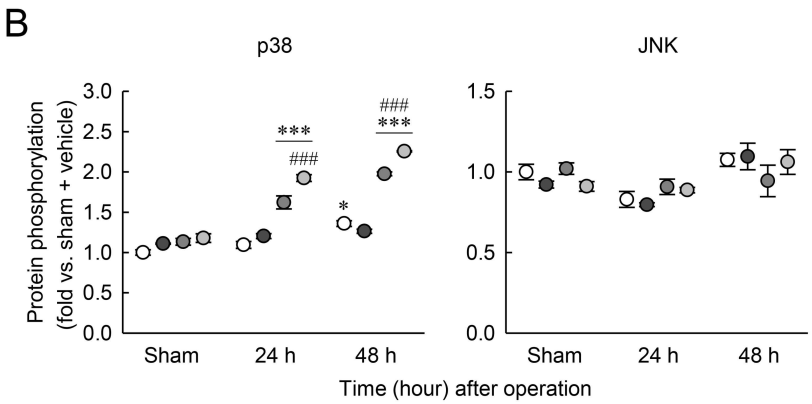
AKT의 활성은 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 회복을 위해 유도되고 nuclear factor erythroid-2-related factor 2(Nrf2)를 통하여 GPX4 등의 항산화 단백질들을 발현하는데 매개자(mediator)로 작용할 수 있다[52]. 본 western blot 분석 결과, 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 증가된 AKT 인산화가 머캅토에탄올에 의해 더

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

욱 증가하였다(그림 14A, B). 그러나 AKT 인산화의 증가는 고농도(몸무게 kg 당 10~30 mg)의 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서만 관찰되었다(그림 14A, B). Sham 수술을 시행한 콩팥에서는 머캅토에탄올 투여가 AKT 인산화에 영향을 주지 않았다(그림 14A, B). AKT 인산화의 결과를 Kruskal-Wallis 검정과 Student-Newman-Keuls 사후검정으로 통계 분석하였을 때, H=60.178, $N_{1\text{-}12}$=6, p<0.001로서 그룹 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이를 통해 머캅토에탄올이 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 AKT 단백질의 활성을 증가시킴을 알 수 있다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY





제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

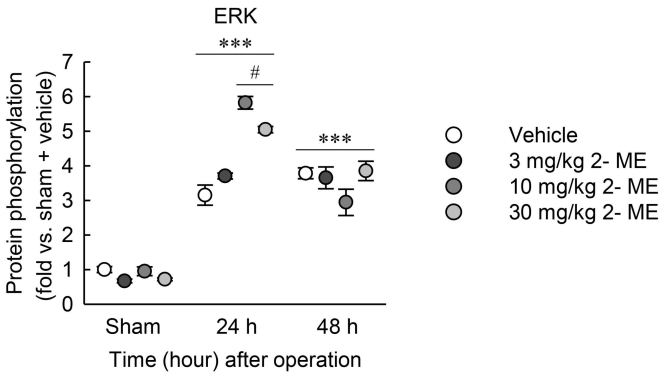


그림 13. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올에 의한 MAPK 활성

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 24시간 및 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion, IRI)을 유도하기 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg당 3, 10, 또는 30 mg을 복강으로 투여하였다. (**A**) Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 중 p38 (p38), extracellular signal-regulated kinases(ERK), c-Jun N-terminal kinases(JNK)의 인산화(phosphorylation)를 western blot 분석 방법으로 측정하였다. Anti-β-actin 항체는 동일한 단백질 정량을 나타내기 위해 사용되었다. (**B**) p38, ERK, JNK 인산화를 수치화하였다. p38 인산화 결과는 정규 분포(normal distribution)를 나타냄으로서 two-way analysis of variance(ANOVA)와 Tukey 사후(post hoc)검정을 이용하여 통계 분석하였다. JNK와 ERK 인산화는 정규 분포(normal distribution)를 나타내지 않았기 때문에 비모수 검정(non-parametric test) 중 Kruskal-Wallis 검정과 Student-Newman-Keuls 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. 모든 그래프는 평균(mean) ± 표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시되었다. *, p<0.05; ***, p<0.001 versus sham; #, p<0.05; ###, p<0.001 versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

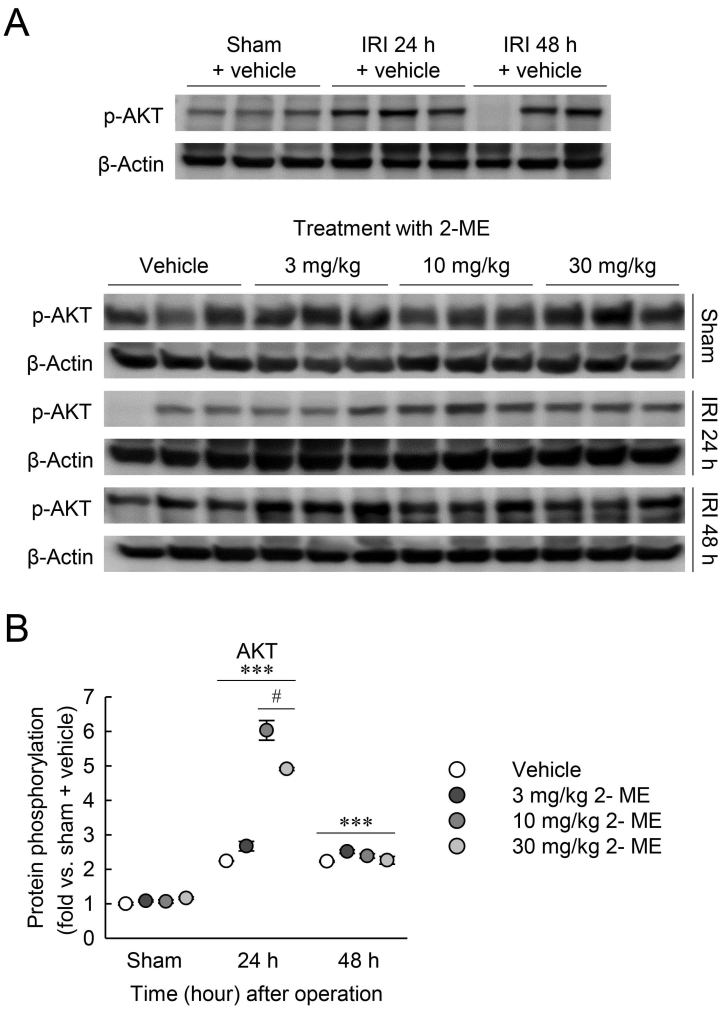


그림 14. 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올 투여에 의한 AKT 활성

생쥐의 양측 콩팥을 30분 동안 허혈(ischemia) 또는 sham 수술한 후 24시간 및 48시간 동안 재관류(reperfusion)하였다. 콩팥 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion, IRI)을 유도하기 24시간 전부터 매일 0.9% 식염수(vehicle)에 용해된 머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME)을 몸무게 kg당 3, 10, 30 mg 용량으로 복강 투여하였다. (**A**) Protein kinase B(AKT) 인산화(phosphorylation)는 western blot 분석 방법으로 측정하였다. (**B**) AKT 인산화를 수치화하였다. 모든 결과는 Kruskal-Wallis와 Student-Newman-Keuls 사후(post hoc)검정으로 통계 분석하였다. ***, $p<0.001$ versus sham; #, $p<0.05$ versus vehicle.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅳ. 고찰

콩팥 허혈-재관류 손상은 종, 성별, 연령에 상관없이 급성콩팥손상의 가장 흔한 원인 중 하나로 여러 연구와 치료의 발달에도 불구하고 급성콩팥손상의 사망률은 여전히 높다. 콩팥 허혈-재관류 손상의 기전(mechanism)은 저산소증 이후 산소가 다시 공급되면서 활성산소종 및 관련 물질들이 요세관 상피세포의 세포사를 야기하는 것이다. 이 과정에서 요세관 상피세포는 심각한 DNA 손상을 받게 되며, 특히 DNA 이중가닥 절단은 다른 유형의 DNA 손상보다 복구가 상대적으로 더 어렵기 때문에 병리적으로 중요하게 간주한다[15]. 왜냐하면 절단된 DNA 이중가닥에서 손실(loss), 증폭(amplification) 또는 자리옮김(translocation)이 쉽게 발생할 수 있으며, 이는 비전형적 염색체(chromosome)의 모양을 가지는 원인이 되기 때문이다[53]. 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 염색체 이상 및 염색체 손상은 요세관 상피세포의 세포사를 일으키게 된다[41,54]. 그러나 콩팥 허혈-재관류 손상에서 DNA 이중가닥 절단을 보호하거나 이미 진행된 DNA 이중가닥 절단을 올바르게 복구시키기 위한 연구는 여전히 필요하다. 본 연구에서는 다음 몇 가지 새로운 결과들을 보여주었다. 첫째, 머캅토에탄올의 전처치와 후처치는 허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능적 저하와 구조적 손상을 예방하였다. 둘째, 머캅토에탄올 투여는 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유도된 요세관 상피세포의 DNA 이중가닥 절단을 방지하였다. 셋째, 허혈-재관류로 손상된 콩팥에서 머캅토에탄올 투여는 ATM 신호전달경로의 활성을 유도하였다. 넷째, 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올 투여는 GPX4 단백질의 과발현을 유도하였고 이는 콩팥의 기능적 및 구조적 손상을 보호하는 기전과 연관되어 있는 것으로 보였다. 마지막으로, 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 머캅토에탄올 투여는 MAPK와 AKT 활성을 더욱 높였다.

콩팥은 사구체에서 혈액을 여과(filtration)하고 요세관에서 재흡수(reabsorption) 또는 분비(secretion)를 통해 노폐물을 제거하여 몸의 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 장기이다. 그러므로 콩팥 기능의 저하는 다양한 질환에서 이환률

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(morbidity rate)과 사망률의 증가와 관련이 있다[55]. 콩팥 기능의 대표적 지표인 creatinine은 근육에서 생성되는 노폐물로 대부분 콩팥을 통해 배출되며 콩팥 이외 다른 장기들의 영향을 받지 않는다[56]. 즉 콩팥에서 creatinine을 여과시키지 못하면 혈액 내 creatinine이 축적되기 때문에 혈액 내 creatinine의 높은 농도로 콩팥 기능이 저하되었다는 사실을 알 수 있다[57]. 본 연구에서 콩팥 허혈-재관류 손상을 받은 생쥐의 혈액 내 혈장 creatinine 수치가 증가함으로서 콩팥 기능이 저하되었음을 알 수 있었다. 그러나 머캅토에탄올 투여는 허혈-재관류로 인한 혈장 creatinine 수치의 증가를 유의하게 감소시켰다. 콩팥 기능의 또 다른 지표인 BUN 수치는 허혈-재관류 후 24 시간과 48시간에서 유의하게 증가하였지만, 머캅토에탄올 투여의 효과는 48시간에서만 나타났다. 특이한 점은 sham 수술을 시행한 생쥐에서 오히려 머캅토에탄올 투여가 BUN 수치를 유의하게 증가시켰다. 이 BUN 수치의 증가가 머캅토에탄올의 독성으로 인한 것인지 조사하기 위해 추가적으로 체중 변화를 비교하였다. Sham 수술한 생쥐에서 머캅토에탄올을 투여한 그룹과 vehicle을 투여한 그룹을 비교하였을 때, 유의한 차이가 없었다. 그리고 동일한 생쥐의 콩팥에서 PAS 염색을 이용한 조직학적 손상과 γH2AX 항체를 이용한 DNA 이중가닥 절단도 관찰되지 않았다. 이는 sham 수술한 생쥐에서 머캅토에탄올 투여에 의한 BUN 수치의 증가가 머캅토에탄올의 독성과 연관이 없음을 나타낸다. Creatinine과 마찬가지로 BUN도 콩팥을 통해 배설되기 때문에 콩팥 기능의 지표로 사용될 수 있지만, 고단백 식이요법, 나이, 신경호르몬 등의 영향으로 BUN 수치가 달라질 수 있으므로 주된 콩팥 기능 지표로 사용되는데 한계가 있는 것으로 보인다[58]. 더욱이 BUN 수치는 심장병, 쇼크, 스트레스, 위장관 출혈 등 여러 가지 질환에 따라 증가할 수 있고, 반대로 간 기능 저하 및 영양실조 상태에서 BUN 수치가 낮아질 수 있다[59].

이황화결합(disulfide bond)을 환원시키는 물질로 잘 알려진 머캅토에탄올은 냄새가 역하고 기도(airway) 등에도 자극을 주기 때문에 독성이 있는 것으로 알려져 있지만, 전임상 모델을 이용한 연구에서 저농도의 머캅토에탄올은 종양 및 염증 억제와 수명 연장 등의 이점을 가진 것으로 보고된 바가 있다[60]. 그리고 머캅토에탄올의 50% 치사량은 생쥐에게 경구 투여 시 최대 일일 평균 섭취량이

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

몸무게 kg 당 345 mg이고, 복강으로 투여 시 몸무게 kg 당 322 mg이므로[25] 상대적으로 치사량이 높지 않다. 이를 바탕으로 본 실험에서는 몸무게 kg 당 3~30 mg을 사용하였다. 그리고 머캅토에탄올에서는 환원된(reduced) GSH에 보이는 thiol을 가지고 있다. 이 thiol은 단백질, 특히 전사인자(transcription factor)의 활성을 조절하고 단백질의 구조를 결정할 수 있다[61]. 이전 다른 연구팀에서는 thiol을 포함하고 있는 dithiothereitol과 cystein이 방사선 조사로 유발된 hydroxyl radical 제거를 통해 DNA 손상을 보호한다고 보고하였다[62-64]. 본 연구에서는 다른 thiol 화합물과 상대적으로 비교하였을 때, 높은 수용성을 갖는 단순한 화학구조의 thiol 화합물인 머캅토에탄올을 생쥐에게 투여하여 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 DNA 이중가닥 절단의 변화를 관찰하였다. γH2AX 염색을 이용한 DNA 이중가닥 절단은 vehicle을 투여한 생쥐의 콩팥과 비교하였을 때, 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서 현저하게 줄어들었다. 특히 머캅토에탄올은 콩팥 허혈-재관류 손상 후 DNA 손상 반응 단백질인 ATM, Chk1, Chk2의 활성을 증가시켰고 그 결과, 콩팥 기능 저하 및 요세관 손상을 감소시켰다. 본 연구 결과와 유사하게, 다른 thiol 화합물인 N-acetylcysteine을 투여하면 이온화 방사선(ionizing radiation)[65], 구리(Cu)의 과다 노출[66], 담배 연기[67]로 인한 γH2AX 발현과 조직 손상을 감소시켰다. 그리고 N-acetylcysteine는 doxorubicin으로 유발된 세포 손상에서 DNA 손상 반응 단백질인 ATM의 활성을 증가시켰다[68].

세포핵(nucleus) 내 DNA 이중가닥 절단이 발생하는 초기 단계에 H2A.X variant histone 단백질이 서열 139번 serine의 인산화 과정을 통해 γH2AX로 생성된다[69]. γH2AX는 DNA 손상 반응을 감지하는 중요한 역할을 담당하고 있으며, DNA 이중가닥 절단 부위에서 DNA 복구와 관련된 upstream sensor kinase와 downstream effector kinase를 불러들이고 이들의 활성을 유도한다[70]. 따라서 γH2AX는 일반적으로 DNA 이중가닥 절단에 대한 정량적 마커로 사용된다. 이전 다른 연구팀에서 시스플라틴(cisplatin) 투여로 유도된 급성콩팥손상에서 γH2AX 발현의 증가에 대한 보고를 하였다[11,12]. 이와 유사하게 본 연구에서도 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 γH2AX의 발현이 두드러지게 증가하였고, 특히 면역화학염색을 이용한 조직학적 관찰 결과, γH2AX의 발현(염색)이 콩팥 요세관 상피

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

세포에서 주로 관찰되었다. 그러나 머캅토에탄올을 투여한 생쥐의 콩팥에서는 허혈-재관류로 인한 γH2AX의 발현이 현저하게 줄어들었다.

염색체 이상이 발생하기 전, γH2AX가 발현하는 DNA 이중가닥 절단 주변에서 DNA 손상 반응이 시작된다[41]. DNA 손상 반응의 신호전달경로에서 upstream sensor kinase로 분류되는 ATM, ATR, DNA-PK는 DNA 복구를 개시(initiation)하는 역할을 수행하고 DNA 손상이 상대적으로 심각할 경우 이들의 활성이 증가할 수 있다[71]. 그러나 DNA 손상에 대한 회복이 불가능할 경우, 이 세포들은 비가역적인 세포주기 정지 또는 세포사멸로 진행될 수 있다[71]. 본 연구에서는 허혈-재관류 손상으로 인한 기능 저하 및 조직 손상을 가진 콩팥에서 upstream sensor kinase 중 ATM과 ATR의 활성이 증가하였다. 그러나 ATM 단백질의 신호전달경로에서 downstream effector kinase로 작용하는 Chk1과 Chk2의 활성은 콩팥 허혈-재관류 손상을 받은 콩팥에서 감소하였다. 본 실험 결과와 유사하게, 허혈-재관류 손상을 받은 간(liver) 조직에서 γH2AX 발현과 ATR 활성은 증가하였지만 Chk1 활성은 반대로 감소하였다[72]. 그리고 심근 세포를 이용한 체외(*in vitro*) 실험에서 ATM 활성은 doxorubicin으로 유발된 세포사멸이 진행되는 동안 증가하였지만, Chk1 활성은 반대로 감소하였다[73]. 따라서 본 연구와 다른 팀의 연구결과들을 토대로 허혈-재관류 손상 또는 독성으로 유발된 심각한 DNA 손상은 비록 upstream sensor kinase가 지속적으로 활성되더라도 downstream effector kinase 활성의 감소를 통해 DNA 손상 반응의 신호전달경로가 억제되는 것으로 보인다.

콩팥 허혈-재관류 손상을 받은 생쥐에서 머캅토에탄올 투여는 upstream sensor kinase 중 ATM과 ATM 관련 downstream effector kinase의 활성을 증가시킨다. DNA 이중가닥 절단에 대한 반응으로 ATM은 스스로 인산화가 될 수 있으며, 인산화된 ATM은 downstream effector kinase 중 Chk1과 Chk2의 인산화를 유도한다[74]. 이 과정에서 세포주기는 정지되고 DNA 복구와 관련된 단백질들의 기능은 촉진된다. Upstream sensor kinase 중 ATR과 DNA-PK의 활성은 DNA 단일 가닥 절단[75], DNA 복제 스트레스(replication stress)[76], 그리고 세포사

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

멸로 유도된 DNA 단편화(fragmentation)[77]가 진행되는 동안 유도된다. 한편, XRCC1은 DNA 단일가닥 절단에 대한 복구에 관여하는 단백질로 인식되었지만[78], XRCC1의 인산화는 ATM과 Chk2에 의해 유도된다[79]. 본 연구에서는 콩팥 허혈-재관류 손상이 XRCC1의 인산화를 감소시켰지만, 머캅토에탄올 투여로 인해 XRCC1의 인산화가 유의하게 증가되었다. 이상의 연구 결과는 콩팥 허혈-재관류 손상에 노출된 콩팥에서 머캅토에탄올이 DNA 손상 반응에 관여하는 upstream sensor kinase 중 ATM의 활성을 유도하고 Chk1, Chk2, XRCC1의 활성을 향상시켜 DNA 이중가닥 절단을 보호함을 보여 준다.

콩팥 허혈-재관류 손상이 진행될 때 DNA 이중가닥 절단을 유발시키는 주요한 물질 중 활성산소종이 있다. 이때 손상된 콩팥의 항산화 단백질의 발현과 활성은 감소한다[80-82]. 본 연구에서 콩팥 허혈-재관류 손상은 CuZnSOD, MnSOD, catalase, GPX4의 발현을 모두 감소시키지만, 흥미롭게도 머캅토에탄올을 투여하면 허혈-재관류 손상에 의해 감소된 GPX4의 발현이 증가하였다. GPX4는 세포막(plasma membrane)에서 발생하는 과산화수소(hydrogen peroxide)를 해독하여 물로 변환시키는 항산화 단백질로 알려져 있고, 뿐만 아니라 thymidine peroxide를 억제하는 역할도 보고된 바가 있다[48]. 그리고 GPX4는 세포 내 세포질, 핵, 소포체, 미토콘드리아 등 다양한 세포소기관(organelle)에서 관찰되기 때문에, 핵 내 존재하는 GPX4가 DNA 손상을 보호할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 GPX4 억제가 머캅토에탄올에 의해 약화된 DNA 이중가닥 절단을 다시 악화시키고, ATM 관련 신호전달경로를 감소시켰으며, 결과적으로 허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능 저하와 요세관의 구조 손상을 다시 유발시켰다. 다른 연구팀에서는 세포실험에서 GPX4 발현을 증가시켰을 때, DNA 손상에 대한 방어 효과가 높아짐을 보고하였고[83], 손상받은 생쥐의 뇌에서 N-acetylcysteine가 GPX4 mRNA의 발현을 증가시킴을 보고하였다[84]. 비록 머캅토에탄올이 어떻게 선택적으로 GPX4 단백질의 발현과 upstream sensor kinase 중 ATM의 활성을 증가시키는지를 입증하는 연구가 남아있지만, 본 연구와 이전 다른팀의 연구 결과들을 토대로, 머캅토에탄올에 의해 유도된 GPX4 발현의 증가가 허혈-재관류로 인한 DNA 손상을 억제하기 위한 ATM 관련 신호전달경로를 활성화 시키는 것으로 보인다. 이는 결론적으로

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

허혈-재관류로 인한 콩팥의 기능 저하와 요세관의 구조적 손상에 대한 보호 효과의 결과를 가져오게 된다.

Ferroptosis는 지질과산화와 철(iron)과 연관된 세포사를 말한다[44,45]. Ferroptosis의 역할과 조절은 SLC7A11와 solute carrier family 3 member 2(SLC3A2)로 구성되어있는 아미노산 수송체와 관련이 있다[59]. 그리고 이 수송체를 통해 cystine은 cysteine으로 환원되어 GSH를 합성하는데 사용된다. 머캅토에탄올이 사람으로부터 유래된 fibrosarcoma 세포에서 SLC7A11의 기능 저하로 유도된 ferroptosis를 억제한다는 연구 보고가 있다[85]. 그러나 본 연구에서는 콩팥 허혈-재관류 손상으로 인한 SLC7A11 발현의 감소가 머캅토에탄올에 의해 영향을 받지 않았다. 이를 통해 허혈-재관류 손상에서 나타나는 머캅토에탄올의 보호 효과가 ferroptosis와는 독립적으로 작용함을 시사한다.

그렇다면, 머캅토에탄올은 어떻게 GPX4의 발현을 증가시킬까? MAPK와 AKT는 직접적으로 또는 간접적으로 GPX4의 발현을 증가시킬 수 있다[50,51]. MAPK 신호전달경로는 세포분화(cell differentiation), 세포증식 및 세포사멸을 포함한 여러 과정들을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다[86,87]. 콩팥 허혈-재관류 손상이 MAPK 활성을 증가시킨다는 보고들은 잘 알려져 있으며[88,89], 본 연구에서도 p38과 ERK의 활성이 증가하는 동일한 결과를 확인하였다. 흥미로운 부분은 허혈-재관류로 손상받은 콩팥에서 머캅토에탄올이 p38과 ERK의 활성을 더욱 증가시킨다는 결과이다. 일반적으로 p38은 스트레스 자극에 반응하여 세포사멸 및 세포분화에 관여하지만[87,90], DNA 이중가닥 절단에 의해 p38의 활성이 유도되어 핵으로 이동되고 G2/M 세포주기 정지와 함께 DNA 복구를 유도한다는 연구 결과도 있다[91]. 그리고 ERK는 주로 세포증식과 관련하여 여러 조직의 세포 손상을 보호한다[87,90]. 한편, AKT는 세포증식, 세포사멸 및 세포분화를 조절하는데 중요한 역할을 하고, MAPK의 활성을 유도하기도 한다[92]. 본 연구 결과에서는 콩팥 허혈-재관류 손상 이후 24시간에서 머캅토에탄올에 의해 AKT의 활성이 증가되었다. 하지만, 허혈-재관류로 손상받은 콩팥에서 머캅토에탄올에 의해 활성화된 p38, ERK, AKT가 GPX4 발현과 연관이 있는지 확인하기 위해서는 관련 억제제 투여

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

및 유전자 결손 시스템을 이용한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 머캅토에탄올은 GPX4 발현의 증가 및 ATM 관련 신호전달경로의 활성을 통해 콩팥 허혈-재관류 손상으로 유발된 DNA 이중가닥 절단에 대한 보호 효과가 있음을 증명하였다. 본 연구 결과는 다양한 장기에서 허혈-재관류 손상으로 유발된 DNA 손상 예방을 위한 새로운 치료 전략을 제공할 것이다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 참고문헌

1. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. J Am Soc Nephrol. 2005;16:3365-70.
2. Kim J, Kim KY, Jang HS, Yoshida T, Tsuchiya K, Nitta K, et al. Role of cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase in ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2009;296:F622−33.
3. Kim J, Jang HS, Park KM. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;298:F158−66.
4. Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury. Annu Rev Med. 2016;67:293−307.
5. Sharapov MG, Goncharov RG, Filkov GI, Trofimenko AV, Boyarintsev VV, Novoselov VI. Comparative Study of Protective Action of Exogenous 2-Cys Peroxiredoxins (Prx1 and Prx2) Under Renal Ischemia-Reperfusion Injury. Antioxidants (Basel). 2020;9(8):680.
6. Ray SC, Mason J, O'Connor PM. Ischemic renal injury: can renal anatomy and associated vascular congestion explain why the medulla and not the cortex is where the trouble starts? Seminars in nephrology. Semin Nephrol. 2019;39:520−9.
7. Briggs JP, Kriz W, Schnermann JB. Overview of kidney function and structure. Primer on Kidney Diseases. 2009;2-18.
8. Scholz H, Boivin FJ, Schmidt-Ott KM, Bachmann S, Eckardt KU, Scholl UI, et al. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. Nat Rev Nephrol. 2021;17:335−49.
9. Kim J, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species differently regulate renal tubular epithelial and interstitial cell proliferation after ischemia and reperfusion injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;298:F1118−29.
10. Yoon SP, Kim J. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation links ischemic acute

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

kidney injury to interstitial fibrosis. J Physiol Sci. 2015;65:105–11.

11. Ma Z, Wei Q, Dong G, Huo Y, Dong Z. DNA damage response in renal ischemia-reperfusion and ATP-depletion injury of renal tubular cells. Biochem Biophys Acta. 2014;1842:1088–96.
12. Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem. 2008;283:6572–83.
13. Kishi S, Brooks CR, Taguchi K, Ichimura T, Mori Y, Akinfolarin A, et al. Proximal tubule ATR regulates DNA repair to prevent maladaptive renal injury responses. J Clin Investig. 2019;129:4797–816.
14. Yan M, Tang C, Ma Z, Huang S, Dong Z. DNA damage response in nephrotoxic and ischemic kidney injury. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;313:104–8.
15. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet. 2001;27:247–54.
16. Jeggo PA. A break is not the end; insight into the damage response to DNA double strand breaks. DNA Repair. 2010;9:1217–8.
17. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. Mol Cell. 2017;66:801–17.
18. Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. DNA Repair. 2009;8:1047–54.
19. Liu C, Zhou J, Li Q, Wang L, Liao Z, Xu H. DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. J Inorg Biochem. 1999;75:233–40.
20. Tronche C, Goodman BK, Greenberg MM. DNA damage induced via independent generation of the radical resulting from formal hydrogen atom abstraction from the C1'-position of a nucleotide. Chem Biol. 1998;5:263–71.
21. Mori M, Otoi T, Wongsrikeao P, Agung B, Nagai T. Efects of

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

beta-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4 degrees C for 72 h. Theriogenology. 2006;65:1322−32.

22. Ying Y, Kim J, Westphal SN, Long KE, Padanilam BJ. Targeted Deletion of p53 in the Proximal Tubule Prevents Ischemic Renal Injury. J Am Soc Nephrol. 2014;25(12):2707-16.
23. Han SJ, Jang HS, Noh MR, Kim J, Kong MJ, Kim JI, Park JW, Park KM. Mitoxhondrial $NADP^+$-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Deficiency Exacerbates Mitoxhondrial and Cell Damage after Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. J Am Soc Nephrol. 2017;28(4):1200-15.
24. Jang HS, Kim J, Park YK, Park KM. Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys. Transplantation. 2008;85(3):447-55.
25. White K, Bruckner JV, Guess WL. Toxicological studies of 2-mercaptoethanol. J Pharm Sci. 1973;62:237−4.
26. Wang Q, Bin C, Xue Q, Gao Q, Huang A, Wang K, et al. GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis. Cell Death Dis. 2021;12:426.
27. Kim J. Poly(ADP-ribose) polymerase activation induces high mobility group box 1 release from proximal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. Physiol Res. 2016;65:333−40.
28. Kim MJ, Moon D, Jung S, Lee J, Kim J. Cisplatin nephrotoxicity is induced via poly(ADP-ribose) polymerase activation in adult zebrafish and mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2020;318:R843−54.
29. Yoon SP, Kim J. Exogenous spermidine ameliorates tubular necrosis during cisplatin nephrotoxicity. Anat Cell Biol. 2018;51:189−99.
30. Kim JI, Kim J, Jang HS, Noh MR, Lipschutz JH, Park KM. Reduction of oxidative stress during recovery accelerates normalization of primary cilia length that is altered after ischemic injury in murin kidneys. Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304(10):F1283-94.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

31. Kim J. Spermidine rescues proximal tubular ells from oxidative stress and necrosis after ischemic acute kidney injury. Arch Pharm Res. 2017;40(10):1197-1208.
32. Jang HS, Noh MR, Ha L, Kim J, Padanilam BJ. Proximal tubule cyclophilin D mediates kidney fibrogenesis in obstructive nephropathy. Am J Physiol renal Physiol. 2021;321(4):F431-42.
33. Yoon SP, Kim J. Exogenous CGRP upregulates profibrogenic growth factors through PKC/JNK signaling pathway in kidney proximal tubular cells. Cell Biol Toxicol. 2018;34:251−62.
34. Moon D, Kim J. Cyclosporin A aggravates hydrogen peroxide-induced cell death in kidney proximal tubule epithelial cells. Anat Cell Biol. 2019;52:312−23.
35. Moon D, Kim J, Yoon SP. Yeast extract inhibits the proliferation of renal cell carcinoma cells via regulation of iron metabolism. Mol Med Rep. 2019;20(4):3933-41.
36. Moon D, Padanilam BJ, Jang HS, Kim K. Extraneural CGRP Upregulates TGF-b1 through RAMP1 Signaling during Mechanical Stretch in Kindey Proximal Tubule Epithelial Cells. Anta Biol Anthropol. 2020;33(4):173-80.
37. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair. 2004;3:959−67.
38. Su W, Cao R, Zhang XY, Guan Y. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. Am J Physiol Renal Physiol. 2020;318:F193-203.
39. Castrop H, Schieβl IM. Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). Am J Physiol Renal Physiol. 2014;307(9):F991-1002.
40. C Lytle, J C Xu, D Biemesderfer, B Forbush 3rd. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. Am J Physiol. 1995;269(6 Pt 1):C1496-505.
41. Pressly JD, Park F. DNA repair in ischemic acute kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2017;312:F551−5.
42. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. DNA

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Repair. 2004;3:1109−15.

43. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol. 1986;251:F765−76.
44. Cao JY., Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. Cell. Mol. Life Sci. 2016;73:2195-2209.
45. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. Cell. 2012;149(5):1060-72.
46. Ni L, Yuan C, Wu XI. Targeting ferroptosis in acute kidney injury. Cell Death Dis. 2022;13(2);182.
47. Yan HF, Tuo QZ, Lei P. The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. Zool Res. 2020;41(3);220-30.
48. Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. FEBS Lett. 1997;410:210−2.
49. Han SJ, Lee HT. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury. Kindey Res Clin Pract. 2019;38(4);427-40.
50. Wang H, Peng S, Cai J, Bao S. Sliencing of PTPN18 Induced Ferroptosis in Endometrial Cancer Cells Through p-p38-Mediated GPX4/xCT Down-Regulation. Cancer Manag Res. 2021;13:1757-65.
51. Akca H, Demiray A, Aslan M, Acikbas I, Tokgun O. Tumour suppressor PTEN enhanced enzyme activity GPx, SOD and catalase by suppression of PI3K/AKT pathway in non-small cell lug cancer cell lines. J Enzyme Inhib Med Chem. 2013;28(3):539-44.
52. Gou Z, Su X, Hu X, Zhou Y, Huang L, Fan Y, Li J, Lu L. Melatonin improves hypoxic-ischemic brain damage through the Akt/Nrf2/Gpx4 signaling pathway. Brain Res Bull. 2020;163:40-48.
53. Bignold LP. Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: a critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

ends to strand-breaking enzymes. Mutat Res. 2009;681:271-98.
54. Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutaʊtions and oncogenic transformation. Mutagenesis. 1992;7:3-12.
55. 홍진영, 구현정, 이우창, 전사일, 민원기, 조은정, 정태동. 신장질환에서 크레아티닌 검사의 의의와 표준화의 필요성 및 현황. 주간 건강과 질병. 2021;14(50):3566-72.
56. Howard TE. Clinical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. 1989;4:58-62.
57. Couchoud C, Pozet N, Labeeuw M, Pouteil-Noble C. Screening early renal failure: cut-off values for serum creatinine as an indicator of renal impairment. Kidney Int. 1999;55(5):1878-84.
58. Maacedo E, Mehta R. Clinical Approach to Diagnosis of Acute Kidney injury. National Kidney Foundation Primer on Kidney Diseases (Sixth Edition). 2014;294-303.
59. Tang D, Kroemer G. Ferroptosis. Curr Biol. 2020;30(21):R1292-97.
60. Wong S, Kirkland JL, Schwanz HA, Simmons AL, Hamilton JA, Corkey BE, et al. Effects of thiol antioxidant β-mercaptoethanol on diet-induced obese mice. Life Sci. 2014;107:32-41.
61. Deneke SM. Thiol-based antioxidants. Curr Top Cell Regul. 2001;36:151-80.
62. Tiwari P, Kumar A, Balakrishnan S, Kushwaha H, Mishra KP. Radiation-induced micronucleus formation and DNA damage in human lymphocytes and their prevention by antioxidant thiols. Mutat Res. 2009;676:62-8.
63. Held KD, Hopcia KL. Role of protein thiols in intrinsic radiation protection of DNA and cells. Mutat Res. 1993;299:261-9.
64. Zheng S, Newton GL, Gonick G, Fahey RC, Ward JF. Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. Radiat Res. 1988;114:11-27.
65. Kang M, So E, Simons A, Spitz D, Ouchi T. DNA damage induces reactive

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. Cell Death Dis. 2012;3:e249.

66. Guo H, Ouyang Y, Wang J, Cui H, Deng H, Zhong X, et al. Cu-induced spermatogenesis disease is related to oxidative stress‐mediated germ cell apoptosis and DNA damage. J Hazard Mater. 2021;416:125903.
67. Toyooka T, Ibuki Y. Cigarette sidestream smoke induces phosphorylated histone H2AX. Mutat Res. 2009;676:34–40.
68. Brum G, Carbone T, Still E, Correia V, Szulak K, Calianese D, et al. N-acetylcysteine potentiates doxorubicin-induced ATM and p53 activation in ovarian cancer cells. Int J Oncol. 2013;42:211–8.
69. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem. 1998;273:5858–68.
70. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. J Nucleic Acids. 2010;2010:920161.
71. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol Cell. 2010;40:179–204.
72. Sha Z, Yang Y, Liu R, Bao H, Song S, Dong J, et al. Hepatic ischemia-reperfusion injury in mice was alleviated by Rac1 inhibition-more than just ROS-inhibition. J Clin Transl Hepatol. 2022;10:42–52.
73. Xie L, Pi X, Wang Z, He J, Willis MS, Patterson C, et al. Depletion of PHD3 protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. J Mol Cell Cardiol. 2015;80:156–65.
74. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature. 2003;421:499–506.
75. Ma M, Rodriguez A, Sugimoto KJ. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition. Curr Genet. 2020;66:327–33.
76. Ward IM, Minn K, Chen J. UV-induced ataxia-telangiectasia‐mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. J Biol Chem.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2004;279:9677−80.

77. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. DNA Repair. 2006;5:575−90.
78. Brem R, Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. Nucleic Acids Res. 2005;33:2512−20.
79. Chou WC, Wang HC, Wong FH, Ding S-L, Wu PE, Shieh SY, et al. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. EMBO J. 2008;27:3140−50.
80. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. Mol Cell Biochem. 1993;125:97−104.
81. Kim J, Seok YM, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2009;297:F461−70.
82. Kim J, Kil IS, Seok YM, Yang ES, Kim DK, Lim DG, et al. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. J Biol Chem. 2006;281:20349−56.
83. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. Biochem J. 2000;351:183−93.
84. Chen C-M, Yin M-C, Hsu C-C, Liu T-C. Antioxidative and anti-infammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. Nutrition. 2007;23:589−97.
85. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. Cell Death Differ. 2016;23(3):369-79.
86. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 2001;22(2);153-83.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

87. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 2002;12(1):9-18.
88. Fawzy MA, Maher SA, Bakkar SM, El-Rehany MA, Fathy M. Pantoparazole Attenuates MAPK (ERK1/2, JNK, p38)-NF-κB and Apoptosis Signaling pathways after Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rat. Int J Mol Sci. 2021;22(19):10669.
89. Luo F, Shi J, Shi Q, Xu X, Xia Y, He X. Mitogen-Activated Progein Kinases and Hypoxic/Ischemic Nephropathy. Cell Physiol Biochem. 2016;39(3):1051-67.
90. Xia Z, Dickens, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science. 1995;270(5240):1326-31.
91. Wood CD, Thorntone TM, Sabio G, Davis RA, Rincon M. Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. Int J Biol Sci. 2009;5(5):428-37.
92. Jubai FF, Zainalabidin S, Taib IS, Abdul Hamid Z, Mohamad Anuar NN, Jalil J, et al. The Role of PKC-MAPK Signalling Pathways in the Development of Hyperglycemia-Induced Cardiovascular Complication. Int J Mol Sci. 2022;23(15):8582.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

영문 초록

Kidney ischemia-reperfusion injury (IRI) is a major cause of acute kidney injury (AKI) and is characterized by tubular cell death. DNA double-strand breaks is one of major sources of tubular cell death induced by IRI. 2-Mercaptoethanol (2-ME) is protective against DNA damage in some cell line. The aims of this study were to determine whether treatment with 2-ME attenuated DNA double-strand breaks, resulting in reduced kidney dysfunction and tubular injury. Kidney IRI or sham-operation in mice was carried out. The mice were treated with 2-ME, Ras-selective lethal 3 (RSL3, a potent inhibitor of glutathione peroxidase 4 (GPX4)), or vehicle. Kidney function were assessed by plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) concentration. Kidney tubular injury was assessed percentage of injured tubules. DNA double-strand breaks were detected by western blot analysis, immunohistochemistry, and immunofluorescenc using antibody for H2A.X variant histone phosphorylated at serin 139 (γH2AX). Phosphorylation of DNA damage response (DDR) kinases, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and protein kinase B (AKT) and expression of antioxidant enzymes, and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) were measured by western blot analysis. Treatment with 2-ME significantly attenuated kidney dysfunction and tubular injury after IRI. Furthermore, post-treatment with 2-ME improved kidney dysfunction and tubular damage during IRI. Treatment with 2-ME significantly reduced DNA double-strand breaks after IRI. Among upstream sensor kinase of DNA damage response (DDR), IRI induced ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) phosphorylation, but treatment with 2-ME more activated ATM after IRI. IRI decreased phosphorylated of downstream effector kinase including checkpoint kinase 1 (Chk1), checkpoint kinase 2 (Chk2), and X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) in IRI-subjected kidneys. However, treatment with 2-ME significantly activated downstream kinase after IRI. Theses data suggest that 2-ME activates

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

ATM-mediated DDR signaling pathway. IRI reduced expression of kidney antioxidant enzymes including catalase, GPX4, and superoxide dismutases (SOD). However, 2-ME dramatically upregulated GPX4 in IRI-subjected kidneys. Furthermore, inhibition of GPX4 developed adverse IRI consequences including kidney dysfunction, tubular injury, and DNA double-strand breaks as well as inactivation of ATM-mediated DDR signaling pathway after IRI in 2-ME-treated kidneys. In addition, IRI increased activation of p38 (p38), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AKT, but 2-ME significantly more increased their activation after IRI-subjected kidneys. Taken together with these data, 2-ME contributes to protection against DNA double-strand breaks after kidney IRI through GPX4 upregulation and ATM activation, resulting in protect kidney dysfunction and tubular injury.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY