

## 시스플라틴 유발 신손상에서 신장세뇨관 세포자멸사 및 항산화제의 신손상 보호효과

전남대학교 의과대학 내과학교실, <sup>1</sup>생리학교실

배은희 · 이종은<sup>1</sup> · 마성권 · 김수완\*

### Effects of Antioxidants in Cisplatin-Induced Renal Tubular Apoptosis

Eun Hui Bae, JongUn Lee<sup>1</sup>, Seong Kwon Ma and Soo Wan Kim\*

Departments of Internal Medicine and <sup>1</sup>Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

The present study was designed to evaluate the possible renoprotective effects of alpha-lipoic acid ( $\alpha$ -LA) in cisplatin-induced nephropathy and its role in inflammation and apoptosis in the kidney. Male Sprague-Dawley rats, weighing 180~200 g, were used. One group of rats was injected with cisplatin (6 mg/kg intraperitoneally). Another group of rats was injected with cisplatin and co-treated with  $\alpha$ -LA. Rats that received an injection of vehicle only served as controls. Four days later, the mRNA expression of Bax and Bcl-2 was determined by real-time PCR. The protein expression of ED-1, cyclooxygenase-2 (COX2), heat shock protein 72 (HSP72), Bax, and Bcl-2 was determined in the kidney by immunoblotting. Apoptosis was determined by TUNEL staining. Cisplatin-treated rats had decreased creatinine clearance and increased plasma creatinine levels compared with controls.  $\alpha$ -LA treatment lowered plasma creatinine levels and increased creatinine clearance. In cisplatin-treated rats, the mRNA expression of Bcl-2 was decreased, which was attenuated by  $\alpha$ -LA treatment. The protein expression of ED-1, COX 2, HSP72, cleaved caspase-3, and Bax in the kidney was increased compared with controls, whereas that of Bcl-2 was decreased, and these changes were counteracted by  $\alpha$ -LA treatment. TUNEL-positive cells were increased, in association with an increased protein expression of Bax and cleaved caspase-3 in the kidney of cisplatin-induced nephropathy, which was counteracted by  $\alpha$ -LA treatment. These findings suggest that  $\alpha$ -LA is effective in preventing the progression of cisplatin-induced nephropathy, the mechanism of which is associated with anti-inflammation and anti-apoptotic effects.

**Key Words:** *Oxidative stress; Cisplatin; Apoptosis; Inflammation*

## 서 론

시스플라틴은 무기 플래티넘(inorganic platinum) 복합체로 고형종양의 치료에 효과적인 약제로 광범위하게 사용되어지고 있다.<sup>1-3</sup> 하지만 시스플라틴은 신장에서 고농도로 농축되어 근위세뇨관 세포의 괴사를 유발하고, 원위세뇨관의 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>4</sup> 시스플라틴 유발 신독성은 사구체 여과율감소, 신장 세뇨관 괴사 및 세포자멸사를 특징으로 한다.<sup>5</sup> 시스플라틴 유발 신독성의 발생 기전으로는 약제 자체의 신세뇨관 독성과 신장혈관 수축에 의한 혈액학적 변화에 의한다고 알려져 있으며 혈관수축의 발생은 산화질소와 같은 혈관확장 인자와 endothelin 등의 혈관수축인자의 불균형에 의한 것으로 생각된다.<sup>6</sup> 그러므로 이러한 혈관수축/확장과 관련된 기전을 차단하는 물질의 투여에 의해 시스플라틴 유발 신독성의 발생을 억제한다는 동물실험을 기초로 하여 임상적으로도 시스플라틴 유발 신독성 예방에 사용하여 연구되었으나 실제로 이러한 예방효과가 입증되지 못하였다.<sup>7</sup> 이러한 *in vitro*, *in vivo* 연구 결과의 불일치는 시스플라틴 유발 신독성의 병인기전이 서로 다른 여러 가지 기전이 복합되어 작용하기 때문으로 생각되며 이러한 병인기전을 완벽히 규명하지 못하였기 때문이다.

신장세뇨관 세포의 염증반응과 세포자멸사는 시스플라틴 유발 신독성에서 신장손상 및 이로 인한 사구체 여과율 감소의 주요원인 기전이다.<sup>7</sup> 세포자멸사는 크게 내인성(미토콘드리아 매개성), 외인성(수용체 매개성) 및 caspase 비의존형 기전으로 나타난다. 그 중 내인성 기전은 미토콘드리아에서 cytochrome C가 유리되는데 이것은 세포자멸사를 촉진하는 단백질인 Bax와 억제하는 단백질인 Bcl-2에 의해서 조절된다. 유리된 cytochrome C는 caspase 9을 활성화하고 이것이 caspase 3을 활성화하여 세포자멸사를 초래한다.<sup>8</sup>

Alpha-lipoic acid ( $\alpha$ -LA)는 thiol 계 항산화제 화합물로서 당뇨병으로 인한 혈관 내피세포 장애와 신경내 혈류를 개선, 산화스트레스 감소를 통해 당뇨병성 말초 신경병을 개선시킨다고 보고되고 있다.<sup>9</sup> 또한 핵 내 전사인자(NF- $\kappa$ B) 발현을 억제하여 경동맥 손상 흰쥐 모델에서 신생혈관증식을 억제하였고,<sup>10</sup> 패혈증 흰쥐모델에서도 내피세포에서 fractalkine 발현을 억제하여 염증반응을 완화시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>11</sup> 기존의 연구에 의하면 시스플라틴 흰쥐에 항산화제로 잘 알려진 N-acetyl cysteine을 투여한 경우 강력한 신혈관 수축물질로 알려진 isoprostane 증가가 감약 되어 신독성을 예방함이 보고되었다.<sup>12</sup> 이처럼 신독성 모델에서 항산화제 치료가 예방효

과의 가능성이 있음이 제시되고 있고,  $\alpha$ -LA가 최근 동물 및 임상에서 다양한 질환에 효과가 보고되고 있으나 시스플라틴 유발 신독성에서  $\alpha$ -LA의 치료 효과 및 이의 원인기전은 확립되어 있지 않다. 본 연구는 시스플라틴 신독성에서 항산화제 치료 후 신독성의 회복여부와 신장세뇨관 세포자멸사가 회복되는 지를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

실험 동물은 체중 180~200 g의 Sprgue-Dawley 숫쥐를 사용하였다. 전체 실험과정은 전남대학교 의과대학 실험 동물 사용 윤리 규정에 관한 지침을 준수하였다. 시스플라틴 신독성을 유발하기 위하여 복강내로 시스플라틴 6 mg/kg를 주사하였다. 항산화제( $\alpha$ -LA)는 50 mg/Kg로 연속 4일간 하루 1번 복강 내 주사하였다. 정상 대조군은 생리 식염수를 복강내로 주사하였다. 시스플라틴 주입 후 4일째에 실험에 이용하였다.

실험시작 3일전 실험쥐들을 대사상자(metabolic cage)에 3일간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 실험군(n=7)은 24 시간 동안 먹이 섭취를 박탈하였으나, 물의 섭취는 제한하지 않았다. 대조군(n=7)은 같은 시간 동안 먹이와 물을 자유롭게 공급한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 신기능 측정

동물을 대사상자에 넣고 유지하면서 매일 소변을 채집하였으며, 요량, 크레아티닌을 측정하였다. 실험 당일 날 pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 마취 하에 개복 후 5 mL 주사기를 이용하여 대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청 크레아티닌을 측정하였다. 크레아티닌 농도는 Jaffe법(Olympus 5431®, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

### 3. Real-time polymerase chain reaction (PCR)

신장 피질 조직에 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 균질화하였다. 여기에 chloroform을 첨가하여 RNA를 추출하고, isopropanol을 첨가하여 침전시켰다. RNA 침전물은 75% ethanol로 세척한 후 증류수로 희석하였다. 분리된 RNA의 농도는 260 nm에서 측정된 optical density 값을 이용하여 정량화하였다. cDNA는 총 RNA 5  $\mu$ g을 oligo (dT) priming과 superscript reverse transcriptase

II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 역전사시켜서 만들었으며, Smart Cycler II system (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 증폭시키고, SYBR Green으로 확인하였다. 각각의 PCR 반응은 10  $\mu$ M forward primer, 10  $\mu$ M reverse primer, 2 $\times$ SYBR Green Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.5  $\mu$ L cDNA와 멸균증류수를 포함하는 최종 20  $\mu$ L의 혼합물로 시행하였으며, PCR Rotor-Gene<sup>TM</sup> 3000 Detector System (Corbette Research, Mortlake, New South Wales, Australia)를 사용하였다. 실험에 사용한 primer는 Bax (sense: AGGATGGCTGGGGAGACACCTG, anti-sense: CATGGGCTGGACACTGGACTTC)와 Bcl-2 (sense: CGGGAGATCGTGATGAGGTACATC, antisense: AACATCGCTCTGTGGATGACTG)이다. PCR 반응 후에는 얻어진 결과는 Corbett Research Software를 이용하여 분석하였다.<sup>13</sup>

#### 4. 단백질 분리 및 Western blot 분석

신장 조직을 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 10 mM Tris-HCl buffer가 함유된 pH 7.6 용액에 넣고 3,000 rpm으로 균질화하였다. 큰 조직 조각과 핵질 파편을 1,000 xg, 15분 저속 회전으로 제거하였다. 단백질 표준은 12.5% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 구성된 불연속계에서 전기영동하여 크기에 따라 분리하였다. 분리된 단백질은 40 V로 3시간 동안 전기영동법으로 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 막을 0.1% Tween-20을 함유한 Tris-based saline buffer [TBST (Amresco, Solon, OH, USA), pH 7.4]로 세척한 후 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% 탈지분유 (NFM)를 포함한 TBST (NFM/TBST)에서 1 시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose 막을 다시 0.2% NFM/TBST 용액에 넣고 1차 항체(ED-1 & HSP 72): Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; COX2: Cayman Chemical Company, MI, USA, Bax and Bcl-2: Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 첨가하여 밤동안 4°C에서 반응시켰다. 발광체를 붙이기 위해 막을 2% NFM/TBST 용액에 넣고 2차 항체[horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (1:1,000)]를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 고정된 항체는 enhanced chemiluminescence [ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)] 반응시켜 Image Reader (LAS-3000 Imaging System, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

#### 5. TUNEL stain

백서를 실험 당일 pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 마취하에 복부를 중앙절개한 뒤 대동맥과 하대정맥을 노출시킨다. 신동맥 상하 대동맥을 clamp하고 하대정맥을 박리하고 phosphate buffered saline (PBS)을 대동맥을 통하여 역행성으로 관류함으로써 5마리씩 각 군 백서를 고정한다. 신장을 제거하고 formalin에 두 시간 고정하고 paraffin에 embed한다. 조직을 xylene으로 5분씩 3번 씻어내고 absolute ethanol로 5분간 2번 95% ethanol로 3분간 1번, 70% ethanol로 3분간 1번 PBS로 5분간 1번 세척하였다. Proteinase K (proteinase K, Dako)로 실온에서 15분간 전처리 후에 3% hydrogen peroxide in PBS에 5분간 씻어냈다. Equilibration buffer를 슬라이드에 투입하고 terminal deoxynucleotidyl transferase와 함께 37°C에서 1시간 배양하였다. 이후 실온에서 anti-digoxigenin peroxide conjugate에 30분간 처리한 뒤 peroxidase substrate를 충분히 슬라이드에 공급하고 haematoxylin에 10분간 대조 염색을 실시하였다. Apoptosis는 Apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (Chemicon International, Temecula, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 6. 통계 처리

실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며, 실험군간 차이에 대한 통계적 유의성 분석은 ANOVA 또는 비쌍체 t-검정법을 사용하였다.

## 결 과

#### 1. 신장의 기능

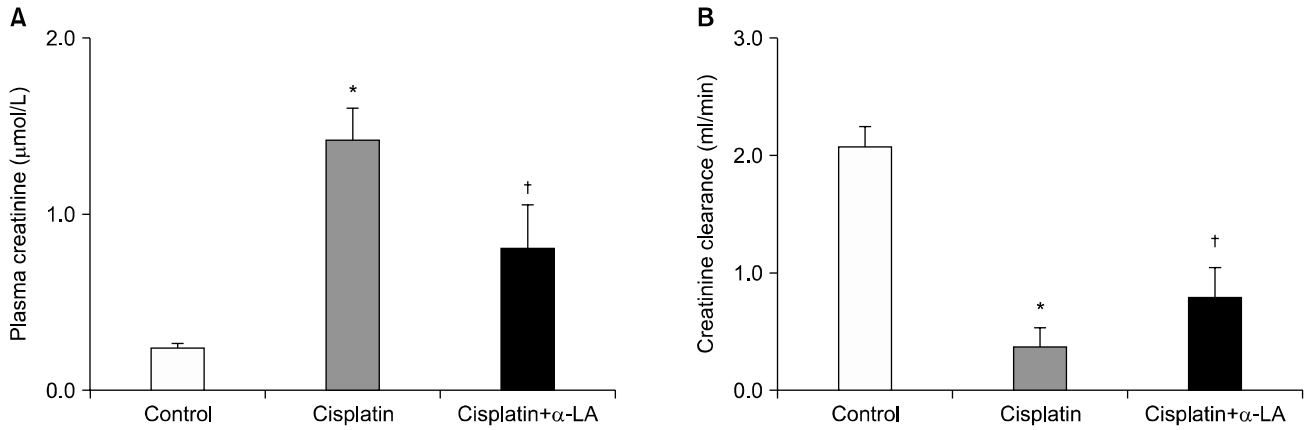
시스플라틴 단독 투여군에서 혈청 크레아티닌의 상승과 사구체 여과율의 감소를 보였으며, 이는  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다(Fig. 1).

#### 2. 염증계의 단백질 발현 변화

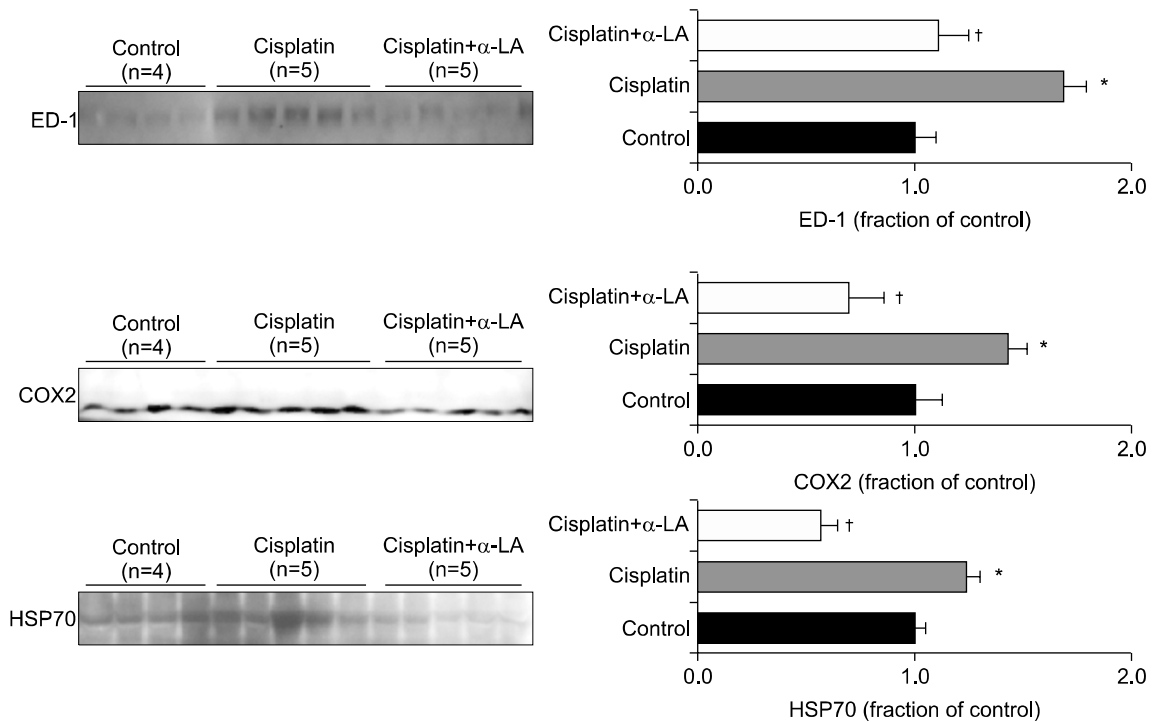
세포 염증 반응시 증가한다고 알려져 있는 ED-1, COX2, HSP72의 단백질 발현이 시스플라틴 단독 투여군에서 현저히 증가 되었으며 이는  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다(Fig. 2).

#### 3. 세포자멸사계의 real-time PCR발현 변화

세포 자멸사를 조장한다고 알려진 Bax의 mRNA의 발현



**Fig. 1.** Effects of alpha lipoic acid ( $\alpha$ -LA) on serum creatinine level and creatinine clearance, \* $p < 0.05$  compared with control, † $p < 0.05$  compared with cisplatin-treated rats.



**Fig. 2.** Effects of alpha lipoic acid ( $\alpha$ -LA) on the protein expression of ED-1, COX2 and HSP70 in the kidney. \* $p < 0.05$  compared with control, † $p < 0.05$  compared with cisplatin-treated rats.

이 시스플라틴 단독 투여군에서 증가,  $\alpha$ -LA 투여로 호전되는 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었다. 그러나 Bcl-2의 mRNA의 발현은 시스플라틴 단독 투여군에서 감소,  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다(Fig. 3).

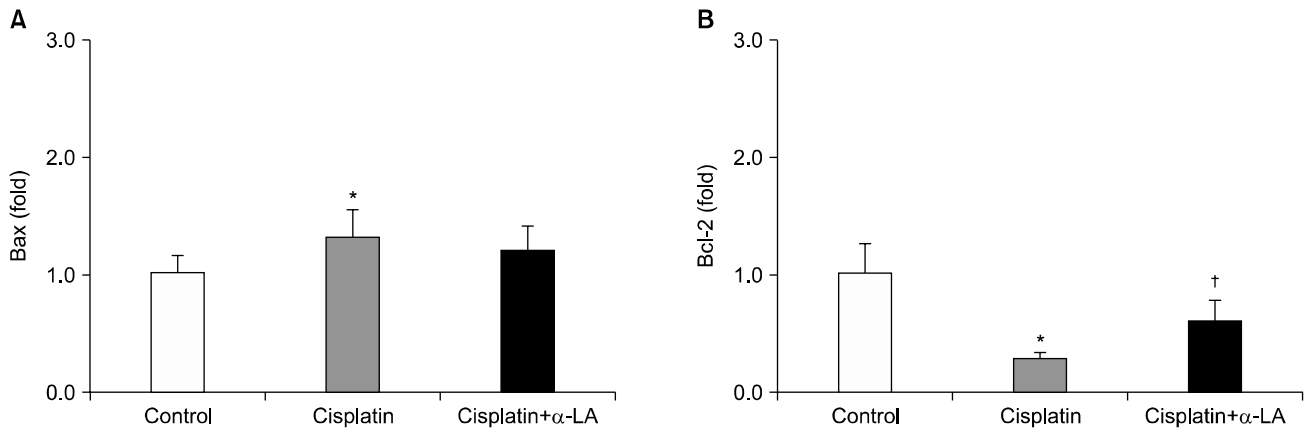
#### 4. 세포자멸사계의 단백질 발현 변화

Bax와 cleaved caspase 3 단백질 발현이 시스플라틴 단독 투여군에서 증가,  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다. 세포 자멸사를

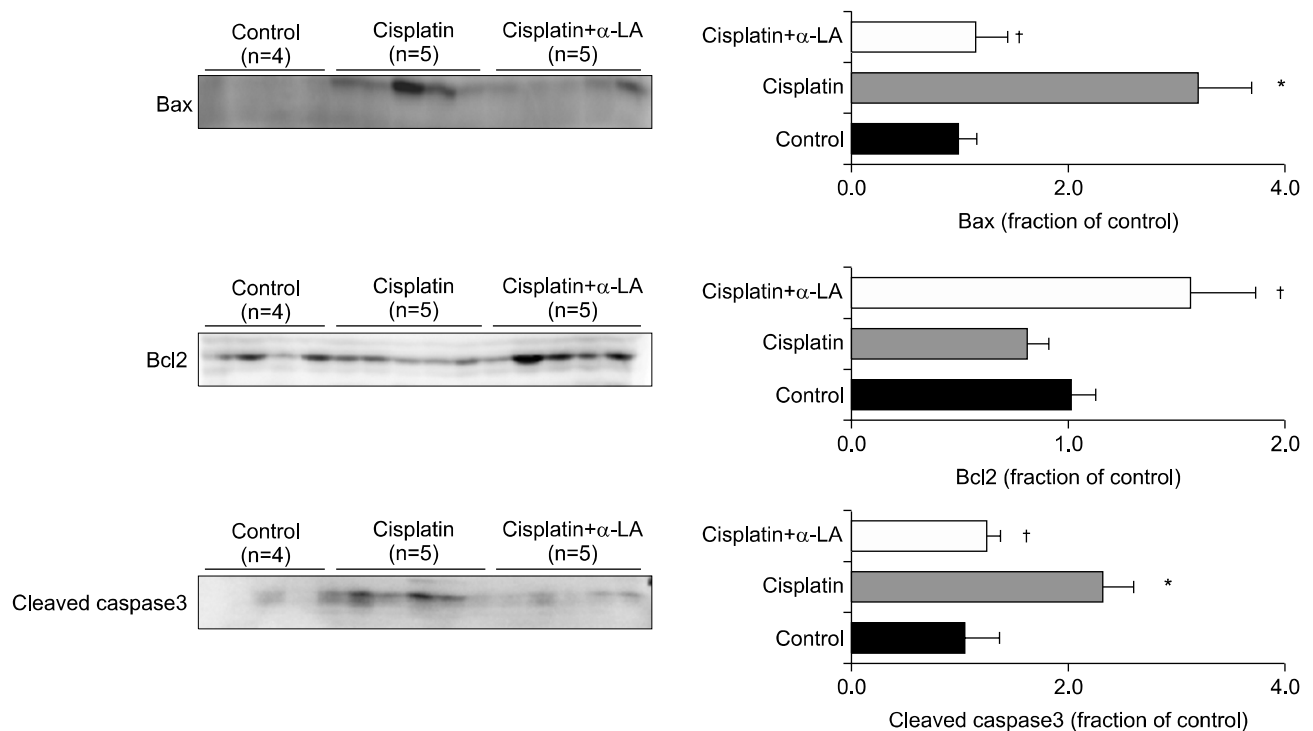
억제한다고 알려진 Bcl-2의 단백질 발현은 시스플라틴 단독 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 의의는 없었고,  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다(Fig. 4).

#### 5. TUNEL 염색

시스플라틴 단독 투여군의 신피질에서 TUNEL 양성세포가 증가된 것을 관찰할 수 있었으며,  $\alpha$ -LA 투여는 이러한 TUNEL 염색 반응 정도를 감약시켰다(Fig. 5).



**Fig. 3.** Effects of alpha lipoic acid ( $\alpha$ -LA) on mRNA expression of Bax and Bcl-2 in the kidney. \* $p < 0.05$  compared with control, † $p < 0.05$  compared with cisplatin-treated rats.

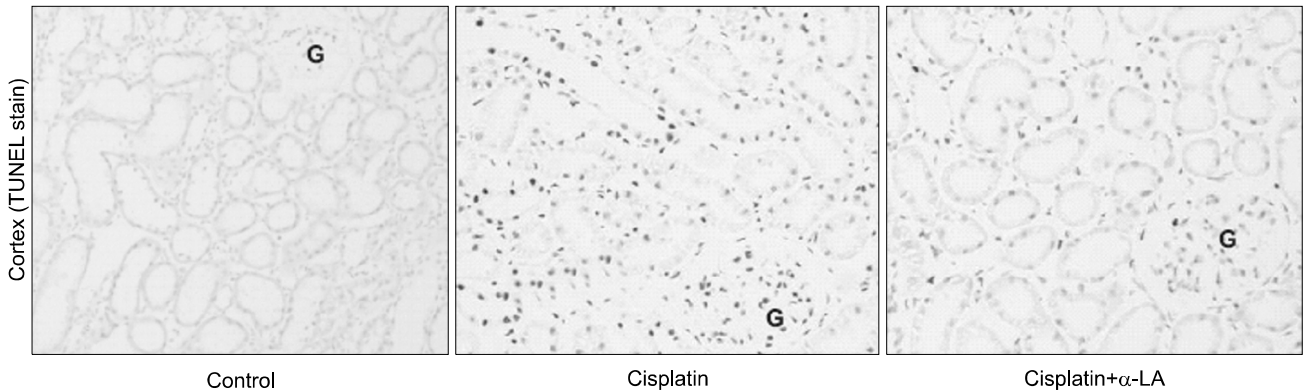


**Fig. 4.** Effects of alpha lipoic acid ( $\alpha$ -LA) on the protein expression of Bax, Bcl-2 and cleaved caspase 3 in the kidney. \* $p < 0.05$  compared with control, † $p < 0.05$  compared with cisplatin-treated rats.

## 고 찰

시스플라틴 유발 신독성에서 신기능 장애 및 사구체 여과율 감소의 병인으로 산화스트레스의 증가,<sup>14</sup> 염증반응 활성화<sup>15</sup> 및 이로 인한 신장세뇨관 세포손상 및 세포 자멸사가<sup>16</sup> 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 시스플라틴 유발 신독성에서는 다양한 염증 유발성 사이토카인 및 케모카인들이 유도된다. 이러한 염증 반응은 신 조직 손상 및 신 기능 저하를

일으키는 것으로 알려져 있는데, 시스플라틴 유발 신독성에서는 특히 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 가 염증 반응을 일으키는 주요 매개물로 연구되고 있다.<sup>17</sup> 대부분의 연구들에서 TNF- $\alpha$ 의 활성화를 억제시키는 경우 시스플라틴 유발 신독성이 감소하는 것으로 나타났다.<sup>18,19</sup> 그러나 시스플라틴 유발 신독성에서 TNF- $\alpha$ 가 유도되는 기전 및 이에 따른 염증 반응의 증가에 의해 신독성이 일어나는 기저 기전에 대해서는 아직까지 연구가 진행되고 있다. 또한 cisplatin



**Fig. 5.** Apoptosis evaluated by TUNEL staining in the kidney sections from different groups of rats. The dark brown dots represent TUNEL-positive nuclei. G: glomerulus.

유발 신독성에서  $\text{TNF-}\alpha$  외에 다른 염증 관련 사이토카인들의 역할은 아직 규명되지 않았다. 최근들어 시스플라틴 유발 신독성의 진행에 다른 면역성 신증의 경우와 마찬가지로 대식세포의 침윤 및 이로 인한 염증반응이 중요한 병리기전인 것으로 보고되고 있다.<sup>20</sup> 신조직 내로 유입된 대식세포는  $\text{TNF-}\alpha$ 와 같은 염증성 chemokine과 cytokine의 합성을 촉진하고, 단백질 분해 효소를 분비하여 세뇨관 세포들을 활성화시킨다. 활성화된 세포들이 다시 염증성 매개체를 분비하여 그 결과 신손상이 더욱 악화된다. 본 연구에서도 대식세포의 표지자인 ED-1이 cisplatin에서 증가,  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다. 또한 염증표지자인 COX2, HSP72의 단백질 발현이 시스플라틴 단독 투여군에서 현저히 증가되었으며, 이는  $\alpha$ -LA 투여로 호전되었다. 신손상 염증반응에 중요한 역할을 한다고 잘 알려진 COX2 뿐만 아니라, HSP도 여러 스트레스한 상황에서 유도되며 고혈압을 포함한 다양한 질환의 병태생리에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>21</sup> HSP는 HSP25, HSP32, HSP 72에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, HSP70은 다양한 스트레스 상황에서 방어 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, HSP70을 과발현시킨 신세포에 시스플라틴 처리했을 때 신세포 손상이 억제된다는 기존 보고<sup>22</sup>가 있어 본 연구에서 시스플라틴군에서 증가한 HSP72은 신손상을 보호하기 위해 증가했을 것으로 생각된다. 이러한 사실은  $\alpha$ -LA가 시스플라틴에 의해 유발된 신장세뇨관 염증반응을 완화시키고 이로 인한 신장손상을 차단할 수 있음을 시사한다.

세포 자멸사는 염증반응과 같은 병적인 원인에 의해 발생하기도 하고 정상적인 세포의 성장과정에서 일어날 수도 있다. 세포 자멸사가 발생하면 세포질의 크기가 축소되고 핵의 염색질의 응축이 일어나 apoptic body를 생성하게 된다. 세

포 자멸사는 DNA fragmentation이나 TUNEL 염색으로 확인할 수 있는데, 많은 연구자들에서 세포 자멸사가 시스플라틴 신독성의 원인이 된다는 것이 밝혀졌다.<sup>5,7</sup> 본 연구에서 시스플라틴 유발 신독성 흰쥐 신장 세뇨관에서 TUNEL 양성 세포가 유의하게 증가하였으며,  $\alpha$ -LA 치료는 이러한 TUNEL 염색 반응 정도를 감약시켰다. 따라서 시스플라틴 유발 신독성 병인에 신장세뇨관 세포 자멸사가 관여하며,  $\alpha$ -LA에 의한 신기능 개선효과는 세포 자멸사 감소에 기인할 것으로 보인다.

Bcl-2 계열의 유전자들은 여러가지 자극에 의해 세포자멸사를 조절하는 단백질을 만드는데, 이 단백질 중 Bcl-2와 Bcl-xl은 세포 자멸사를 억제하고 Bax는 세포 자멸사를 조장하는 것으로 알려져 있다.<sup>23</sup> 따라서 이런 단백질의 발현 여부에 따라 신장세뇨관 세포들이 자멸하거나 살아남게 된다. Bcl-2는 세포 내의 여러 기관에 존재하는 26 kDa의 막 단백질로서 여러종류의 유해자극으로부터 세포의 손상을 방지하는 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>24,25</sup> 비록 정확한 기전은 모르지만 Bcl-2는 endoplasmic reticulum (ER)에서 비정상적인 칼슘유리를 방해하여 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>26</sup> Bax는 21 kDa의 막단백질로서 ER에서 칼슘을 배출시켜 ER의 칼슘을 고갈시키고 미토콘드리아의 칼슘섭취를 조장시켜 세포 자멸사를 조장한다.<sup>27</sup> 본 연구에서 시스플라틴 유발 신독성에서 Bax 단백질발현은 유의하게 증가하였으며, Bcl-2 발현은 감소하였다. 시스플라틴 유발 신손상이 발생하면 cytochrome-c가 유리되고 이것이 apoptosis activating factor (apaf-1)와 procaspase 9과 결합하여 apoptosome을 형성한다. 이것이 caspase 9을 활성화시키고 활성화된 caspase 9가 caspase 3를 활성화시킨다.<sup>7</sup> 본 연구에서 또한  $\alpha$ -LA 치료는 시스플라틴 유발 신독성에서 Bax

발현증가 및 Bcl-2 발현 감소를 회복시켰으며, caspase 3 발현 증가 역시 회복시켰다. 이러한 효과는 시스플라틴 유발 신독성에서 보이는 세포 자멸사 회복의 중요한 원인 기전으로 보인다.

이상의 결과 시스플라틴 유발 신손상은 항산화제인  $\alpha$ -LA에 의해 회복되었으며 그 원인기전에는 항염증반응 및 세포자멸사억제 효과에 기인하는 것으로 보인다.

## 알 림

이 논문은 전남대학교병원 임상의학 연구소 학술연구비 (CRI08055-1)에 의하여 연구되었음.

## References

1. Einhorn LH, Williams SD. The role of cis-platinum in solid-tumor therapy. *N Engl J Med* 1979;300:289-91.
2. Einhorn LH, Donohue J. Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* 1977;87:293-8.
3. Rozencweig M, von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med* 1977;86:803-12.
4. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23:460-4.
5. Kim SW, Lee JU, Nah MY, Kang DG, Ahn KY, Lee HS, et al. Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:875-82.
6. Li Q, Bowmer CJ, Yates MS. Effect of arginine on cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Biochem Pharmacol* 1994;47:2298-301.
7. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008;73:994-1007.
8. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008;73:994-1007.
9. El Midaoui A, de Champlain J. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 2002;39:303-7.
10. Lee KM, Park KG, Kim YD, Lee HJ, Kim HT, Cho WH, et al. Alpha-lipoic acid inhibits fractalkine expression and prevents neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery. *Atherosclerosis* 2006;189:106-14.
11. Sung MJ, Kim W, Ahn SY, Cho CH, Koh GY, Moon SO, et al. Protective effect of alpha-lipoic acid in lipopolysaccharide-induced endothelial fractalkine expression. *Circ Res* 2005;97:880-90.
12. Salahudeen A, Poovala V, Parry W, Pande R, Kanji V, Ansari N, et al. Cisplatin induces N-acetyl cysteine suppressible F2-isoprostane production and injury in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1448-55.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
14. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2683-90.
15. Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:8-15.
16. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2001;60:1726-36.
17. Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:19948-54.
18. Bhatt K, Feng L, Pabla N, Liu K, Smith S, Dong Z. Effects of targeted Bcl-2 expression in mitochondria or endoplasmic reticulum on renal tubular cell apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294: F499-507.
19. He H, Lam M, McCormick TS, Distelhorst CW. Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 1997;138:1219-28.
20. Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 1994;5:411-7.
21. Hamet P, Malo D, Tremblay J. Increased transcription of a major stress gene in spontaneously hypertensive mice. *Hypertension* 1990;15:904-8.
22. Komatsuda A, Wakui H, Oyama Y, Imai H, Miura AB, Itoh H, et al. Overexpression of the human 72 kDa heat shock protein in renal tubular cells confers resistance against oxidative injury and cisplatin toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1385-90.
23. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002;110:835-42.
24. Ramesh G, Brian Reeves W. Cisplatin increases TNF-alpha mRNA stability in kidney proximal tubule cells. *Ren Fail* 2006;28:583-92.
25. Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int* 2007;72:37-44.
26. Yamate J, Tatsumi M, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S. Immunohistochemical observations on the kinetics of macrophages and myofibroblasts in rat renal interstitial fibrosis induced by cis-diamminedichloroplatinum. *J Comp Pathol* 1995;112:27-39.
27. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.