

Deoxycorticosterone Acetate-salt 고혈압 유발 신장손상에서 Tamoxifen의 치료효과

최준석¹, 김인진¹, 김창성¹, 배은희¹, 마성권¹, 이종은², 김수완¹

전남대학교 의과대학¹ 내과학교실² 생리학교실

Effects of Tamoxifen in Deoxycorticosterone Acetate-salt Hypertensive Nephropathy

Joon Seok Choi, MD¹, In Jin Kim, MD¹, Chang Seong Kim, MD¹, Eun Hui Bae, MD¹, Seong Kwon Ma, MD¹, Jong Un Lee, PhD², Soo Wan Kim, MD¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Physiology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background: The present study was designed to evaluate the possible renoprotective effects of tamoxifen in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive (DSH) rats and its role in inflammation and fibrosis in the kidney. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats, weighing 180 to 200 g, were used. All rats underwent unilateral nephrectomy. One week later, one group of rats (n = 8) was implanted with DOCA strips (200 mg/kg) and another group of rats (n = 8) was implanted with DOCA strips with co-treated with tamoxifen (10 mg/kg) through gavage feeding. Rats that did not implanted DOCA strips served as controls (n = 6). Two weeks later, the systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff method. The protein expression of transforming growth factor- β (TGF- β), Smad, α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, ED-1, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) was determined in the kidney by immunoblotting. The mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was determined by real-time polymerase chain reaction. **Results:** In DSH rats, SBP was increased, which was not affected by tamoxifen treatment. Serum creatinine level was comparable in DSH rats compared with controls, which was not affected by tamoxifen treatment. In DSH rats, the protein expression of TGF- β , Smad 2/3, Smad 4, α -SMA, ED-1, COX-2, iNOS was increased compared with controls, and these changes were attenuated by tamoxifen treatment except that of TGF- β . The mRNA expression of TNF- α , MCP-1, and VCAM-1 was increased, and expression of MCP-1 and VCAM-1 was counteracted by tamoxifen treatment. **Conclusions:** Tamoxifen is effective in preventing the progression of nephropathy in DSH rats, the mechanism of which is associated with anti-inflammation and anti-fibrotic effects.

(J Korean Soc Hypertens 2013;19(4):123-131)

Key Words: Desoxycorticosterone acetate; Hypertension; Tamoxifen

서 론

논문접수일: 2013.10.28, 수정완료일: 2013.12.18, 게재승인일: 2013.12.19
교신저자: 김수완
주소: 광주시 동구 제봉로 42 전남대학교 의과대학 내과학교실
Tel: 062) 220-6271 Fax: 062) 225-8578
E-mail: skimw@chonnam.ac.kr

만성신장질환의 유병률은 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며 고혈압이 중요한 원인 질환 중 하나이다.¹⁾ 고혈압에 의한 신장손상의 진행에는 저항의 증가에 의한 사구체기능의 점진적인 감소 이외에도 세포외 기질

의 축적을 통한 광범위한 조직의 섬유화가 연관이 되어 있음이 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 세뇨간질 섬유화는 원인에 관계 없이 모든 비가역적인 진행을 하는 신장질환의 공통된 병인 경로로 세뇨간질 부위의 섬유화 정도가 신장기능의 감소 정도를 결정한다.⁵⁾ 따라서 세뇨간질 섬유화를 억제함으로써 고혈압에 의한 신장손상의 진행을 억제할 수 있을 것으로 생각되나, 현재까지 이의 정확한 조절기전은 밝혀져 있지 않다.

Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt 고혈압은 염류코르티코이드 유발 고혈압의 대표적인 동물모델로 신기능 장애를 수반함이 잘 알려져 있다. DOCA-salt 고혈압 동물모델에서 혈중 레닌농도가 낮지만, DOCA-salt 고혈압 모델은 고알도스테론 혈증을 유발하여 용적의존형 고혈압을 일으키는 부신샘종(adrenal adenoma)의 모델로 이용된다.⁶⁾ 전통적으로 염류코르티코이드가 신장 집합관에서 나트륨 재흡수를 증가시켜 체액증가를 일으킨다고 알려져 있지만, 최근 연구들은 산화스트레스 및, 염증반응의 증가와 더불어 세포 외 기질의 축적을 통한 광범위한 섬유화를 일으키는 신장손상 모델로서도 기능함을 가리키고 있다.^{4,7,8)}

선택적 에스트로겐 수용체 조절자인 tamoxifen은 유방암 예방 및 치료에 널리 사용되고 있으나, 비정상 치유장애에 치료 효과가 있어, 특발성 후복막섬유증식증, 경화성 피막성 복막염 등의 치료에 임상에서 사용되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 이러한 임상적 효과뿐만 아니라 실험연구에서도 메산지 움세포에서 콜라겐의 전사 및 단백 합성을 억제하고,¹²⁾ 피부 섬유모세포 증식 억제,¹³⁾ 상처 수축반응 억제¹⁴⁾ 등이 보고되고 있다. 최근 신장질환에서도 산화질소 합성 억제제인 L-NAME를 30일간 투여한 흰쥐모델에서 신장 섬유화로 인한 손상이 tamoxifen 투여로 회복됨을 보고하였다.¹⁵⁾ 하지만 L-NAME 고혈압은 산화질소 합성억제를 통한 혈관수축에 의한 고혈압 모델로, 고혈압 발생 및 병인기전이 다른 용적 의존형 고혈압에서도 항섬유화 효과 및 신장질환의 진행을 억제하는지는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 이차성 고혈압의 대표적 동물모델인 DOCA-salt 고혈압 신장손상에서 세뇨간질 섬유화가 일어

나는지 알아보고 tamoxifen 치료가 이를 억제할 수 있는지 알아보기로 하였다.

대상 및 방법

1. 동물실험

체중 180-200 g의 Sprague-Dawley 숫쥐를 이용하여 실험을 진행하였다. 이 동물실험은 전남대학교 의과대학 윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다. DOCA-salt 고혈압을 유발하기 위하여 ketamine (50 mg/kg, 복강 내 주입) 마취 하에 왼쪽 신장을 떼어내고, 1주 후 DOCA (200 mg/kg) silastic strip를 측복부 피하에 심었으며 이때부터 1% 식염수 용액을 마실 물로서 공급하였다. 정상 대조군은 왼쪽 신장을 떼어낸 후 DOCA strip을 심지 않고 다른 수술 조작만을 시행하여 그 뒤에는 DOCA-salt군과 같이 1% 식염수를 음용수로 공급하였다. 실험동물군은 정상 대조군 (n = 6), DOCA-salt 고혈압군(n = 8), 그리고 DOCA-salt 고혈압-Tamoxifen 치료군(n = 8)으로 각각 분류하였다. 모든 실험군은 1% 식염수를 음용하였고, tamoxifen 치료군은 DOCA strip를 심는 날부터 2주간 매일 tamoxifen (Nolvadex, 10 mg/kg; AstraZeneca, London, UK)을 구강으로 섭식공급(gavage feeding)하였다. DOCA strip을 심은 2주 후 혈압을 측정하였으며, 수축기혈압은 동물을 36°C에 15분 정도 따뜻하게 한 뒤 마취하지 않은 상태에서 꼬리 동맥으로부터 측정하였다. 실험 당일 쥐들은 마취하지 않은 상태에서 단두한 후 혈액을 채취하였다. 이어 즉시 신장을 채취하여 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

2. 단백 분리 및 전기영동

신장조직을 300 mmol/L sucrose, 25 mmol/L imidazole, 1 mmol/L EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 8.5 μ mmol/L leupeptin, 1 mmol/L PMSF (p-methylsulphonyl-fluoride)로 된 용액(pH 7.2)에서 균질화하였다. 이어서 세포와 핵, 미토콘드리아 등을 제거하기 위하여 1,000 × g, 4°C에서 15분간 원심 분리하였다. 단백 농도는 bicinchoninic acid 측정 키트(BioRad, Hercules, CA, USA)를 사

용하여 측정하였다. 모든 시료는 SDS (sodium dodecyl sulfate)를 포함한 완충액에서 65°C, 15분간 녹여 동일한 최종 농도를 갖도록 하고 -20°C에 보관하였다. 첫 번째 젤을 Coomassie blue로 염색하여 동일한 양의 단백이 실렸는지 확인하였다.

Western blot 분석을 위하여 9-12% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성계(Xcell II Mini-Cell; Novex, San Diego, CA, USA)에서 전기 영동하여 크기에 따라 분류하였다. 그런 다음 단백을 NOVEX blot module을 이용하여 전기 영동(360 mA, 3시간)하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 막을 Tween-20이 들어있는 Tris-based saline buffer (TBST)로 씻고 1시간 동안 TBST에 용해시킨 5% 무지방 건조 우유용액(nonfat dried milk in Tris-buffered saline, NFM/TBS)에서 차단하고, 2% NFM/TBS 내에서 transforming growth factor- β (TGF- β ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Smad 2/3, Smad 4, Smad 6 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), α -smooth muscle actin (α -SMA; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), E-cadherin, ED-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), cloooxygenase-2 (COX-2; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), 그리고 inducible NOS (iNOS; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)를 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 이어서 막을 2% NFM/TBS에서 2시간 동안 horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:1,000)와 함께 반응시킨 뒤 막을 TBST로 다시 4회 세척하고 enhanced chemiluminescence (Amersham, Little Chalfont, UK) 용액에서 10분간 반응하여 Image Reader (LAS-3000 Imaging System; Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan)에 노출시켰다. β -actin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)에 대한 Western blotting도 시행하여 각 단백에 대한 비율을 산출 후 이를 분석하였다.

3. RNA 추출 및 reverse transcription polymerase chain reaction 분석

신장은 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 균질화하였다. RNA는 chloroform을 사용하여 추출하였고, isopropanol을 사용하여 침전시키고 나서 70% ethanol로 씻어 주었다. 마지막으로 멸균수에 RNA를 녹였다. RNA 농도는 흡광도 260 nm (Ultraspec 2000; Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)에서 정량하였다. mRNA의 발현은 real-time polymerase chain reaction (PCR)법으로 측정하였다. cDNA는 total RNA 5 μ g을 사용하여 oligo (dT) primer와 superscript reverse transcriptase II (Invitrogen)를 이용하여 역전사시켜 만들었다. 만들어진 cDNA는 Smart Cycler II System (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 증폭시키고 SYBR Green으로 확인하였다. 각각의 PCR 반응물은 10 μ M forward primer, 10 μ M reverse primer, 2X SYBR Green Premix Ex Taq (Seta 3-4-1; Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 0.5 μ L cDNA, H₂O를 섞어 최종 20 μ L로 만들었다. PCR Rotor-Gene 3000 Detector System (Corbett research, Mortlake, NSW, Australia)을 사용하여 실시하였다. Primer는 이전 문헌에 따라 준비하였다.¹⁶⁾ PCR 단계는 다음과 같이 실시하였다. 즉 1) 95°C에서 5분, 2) 95°C에서 20초, 3) 58-62°C 사이에서 20초 (optimized for each primer pair), 4) 72°C에서 30초, 5) 85°C에서 6초로 하여 SYBR Green을 확인하였다. 2단계부터 5단계를 64 cycle 반복하였고, 녹는 점 곡선을 만들기 위해 마지막 cycle은 60°C에서 90°C로 온도를 올렸다. 반응 후 데이터는 Corbett Research Software로 분석하였다. 상대적인 critical threshold values는 4번 반복하여 GAPDH로 평준화한 다음 유전자 발현 계산에 사용하였다.¹⁷⁾

4. 통계처리

실험성적은 mean \pm standard error of the mean으로 표시하였으며, 유의성 검정은 일원배치분산분석(analysis of variance)을 사용하였다. 모든 검사에서 p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의하다고 인정하였다.

Table 1. Organ weights, blood pressure and renal function

	Control (n = 6)	DSH (n = 8)	DSH + tamoxifen (n = 8)
Body weight (g)	224.2 ± 4.9	231.3 ± 12.5	218.8 ± 12.5*
Systolic blood pressure (mm Hg)	130.1 ± 5.2	173.5 ± 6.2†	170.7 ± 12.0†
Kidney weight (mg)	1238 ± 81	1748 ± 259†	1650 ± 459†
Kidney weight/body weight ratio (mg/g)	5.5 ± 0.3	7.5 ± 0.9†	7.5 ± 1.8†
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.6 ± 1.0	14.7 ± 2.7	14.8 ± 1.6
Creatinine (mg/dL)	0.27 ± 0.08	0.24 ± 0.05	0.27 ± 0.05

Values are expressed as mean ± standard error of the mean. These values are measured at the last day of experiments.

DSH, deoxycorticosterone acetate salt hypertension; DSH + tamoxi, tamoxifen treated DSH rats.

*p < 0.05 compared to DOCA (deoxycorticosterone acetate)-salt hypertensive rats. †p < 0.05 compared to the control. †p < 0.05 compared to the control.

결 과

1. 혈압 변화 및 신기능의 변화

Table 1은 각 군의 혈압, 몸무게 및 신기능을 요약한 것이다. DOCA-salt 고혈압군에서 유의하게 혈압이 증가하였으며 tamoxifen 치료군과 비치료군 간의 유의한 혈압 차이는 관찰되지 않았다. DOCA-salt 고혈압군에서 대조군과 비교하여 신장무게의 증가가 관찰되었으며 tamoxifen 치료군과 비치료군 간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 세 군 간의 혈청 blood urea nitrogen과 creatinine의 차이는 관찰되지 않았다.

2. Tamoxifen 치료에 의한 섬유화 소견의 변화

대조군과 비교하여 DOCA-salt 고혈압군에서 TGF- β , Smad 2/3 그리고 Smad 4의 단백 발현이 유의하게 증가하였으며 Smad 6의 단백 발현은 유의하게 감소하였다. Smad 2/3, Smad 4 그리고 Smad 6 단백의 이와 같은 변화는 tamoxifen 치료에 의해 현저히 완화되었다(Fig. 1). 또한 α -SMA의 단백 발현 역시 DOCA-salt 고혈압군에서 유의하게 증가하였으며 이는 tamoxifen 치료에 의해 완화되었다. 이에 반해 E-cadherin 단백 발현의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

3. Tamoxifen 치료에 의한 염증소견의 변화

대조군과 비교하여 DOCA-salt 고혈압군에서 ED-1, COX-2

그리고 iNOS의 단백 발현이 유의하게 증가하였으며 이와 같은 변화는 tamoxifen 치료에 의해 현저히 완화되었다 (Fig. 3).

4. mRNA 발현의 변화

TNF-a, MCP-1 그리고 VCAM-1의 mRNA 발현이 DOCA-salt 고혈압군에서 대조군에 비해 현저히 증가되었으며 MCP-1 및 VCMA-1의 mRNA 발현은 tamxifen 치료군에서 비치료군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서 저자들은 DOCA-salt 고혈압 유발 흰쥐에서 tamoxifen의 투여가 신장손상의 진행을 억제하는 효과를 관찰하였다. DOCA-salt 고혈압 모델에서는 고혈압의 발생과 신장조직의 섬유화 및 염증소견의 증가가 관찰되었다. 이는 고혈압성 신장병증의 병리 기전에 염증반응에 의한 손상의 발생과 진행, 그리고 섬유화의 진행이 주요 기전으로 작용함을 의미하며 tamoxifen의 투여가 혈압에 대한 유의한 변화를 유발하지 않으면서 신장조직의 섬유화 및 염증소견의 완화를 유도할 가능성을 시사하였다. 본 연구는 만성신장질환의 주요 원인으로 알려져 있는 고혈압성 신장 병증의 발생과 진행을 tamoxifen이 억제할 수 있음을 제시하는 연구라 할 수 있겠다.

여러 신장질환의 병태생리학적 공통 기전인, 사구체경화 및 신장간질의 섬유화의 발생 및 진행에 염증반응이

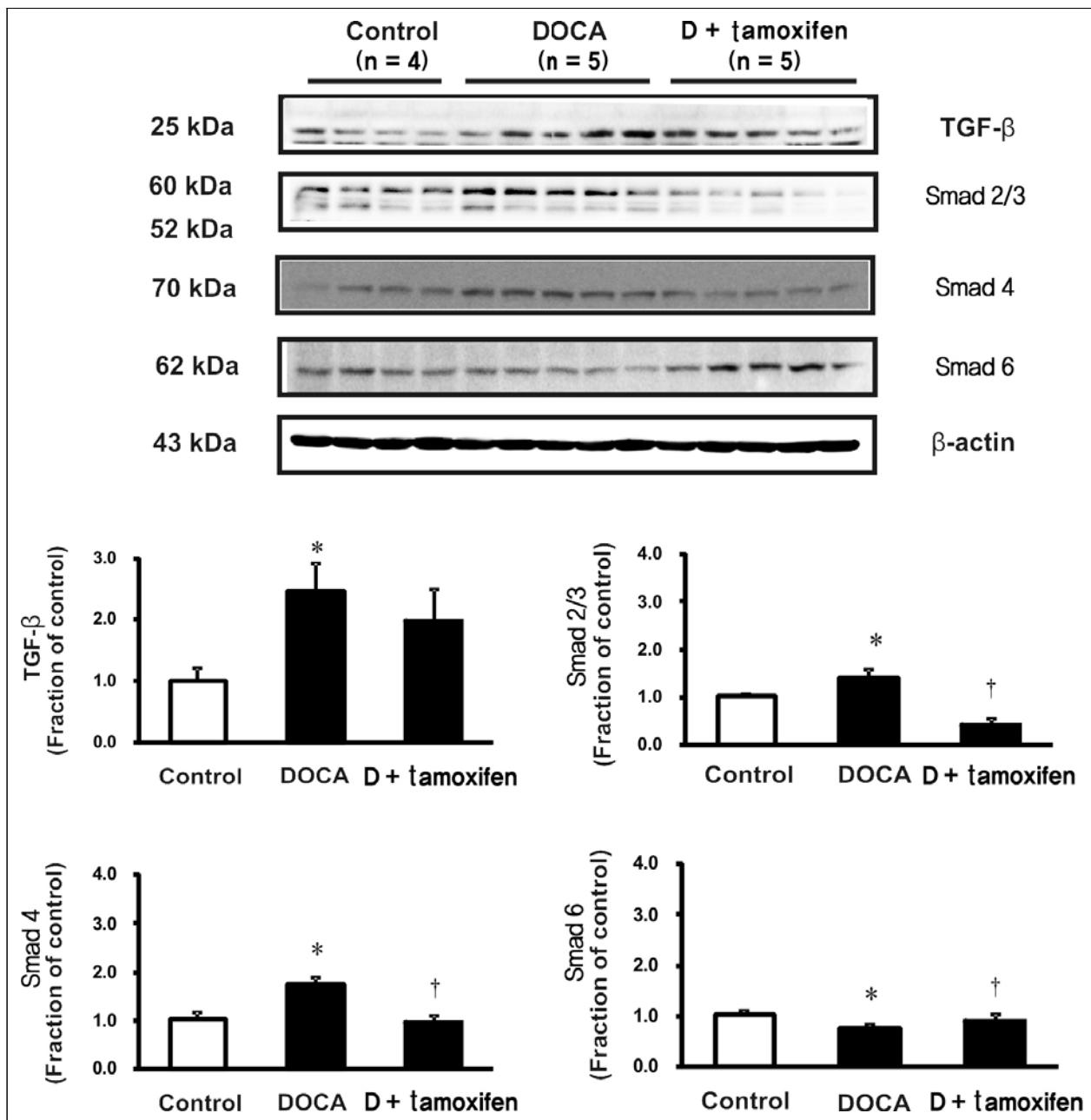


Fig. 1. Effect of tamoxifen on transforming growth factor (TGF)- β 1 and Smad proteins in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. Semiquantitative immunoblotting for TGF- β 1 and Smad 2/3, Smad 4, and Smad 6 proteins. * $p < 0.05$ compared to the control. † $p < 0.05$ compared to DOCA-salt hypertensive rats. DOCA, DOCA-salt hypertensive rats; D + tamoxifen, tamoxifen treated DOCA-salt hypertensive rats.

관여한다는 점은 잘 알려져 있다.¹⁸⁾ DOCA-salt 유발 고혈압 흰쥐 모델은 염류코르티코이드 유발 고혈압성 신장 병증의 대표적인 동물모델로 잘 알려져 있다. 그 기전으로 DOCA strip을 통한 염류코르티코이드 활성증가를 통

하여 고알도스테론혈증을 유발하여 신장 집합관에서 나트륨 재흡수를 증가시켜 체액증가를 일으켜 용적 의존형 고혈압 및 장기손상을 일으킨다고 알려져 왔다.⁶⁾ 하지만 최근 연구들은 nuclear factor Kappa B와 같은 전사인자

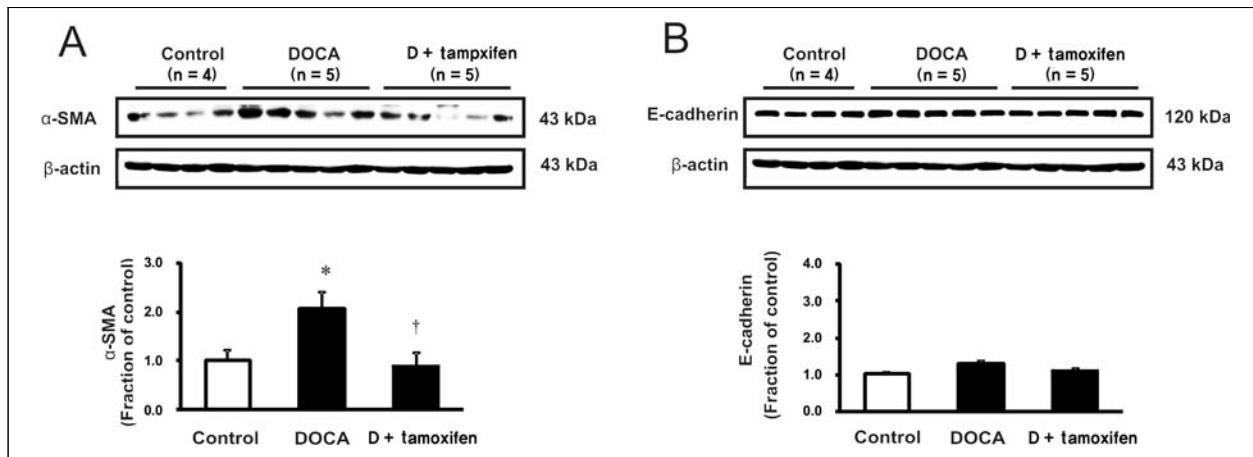


Fig. 2. Effect of tamoxifen on α -smooth muscle actin (α -SMA) and E-cadherin in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. Semiquantitative immunoblotting for α -SMA and E-cadherin proteins. * $p < 0.05$ compared to the control. † $p < 0.05$ compared to DOCA-salt hypertensive rats. DOCA, DOCA-salt hypertensive rats; D + tamoxifen, tamoxifen treated DOCA-salt hypertensive rats.

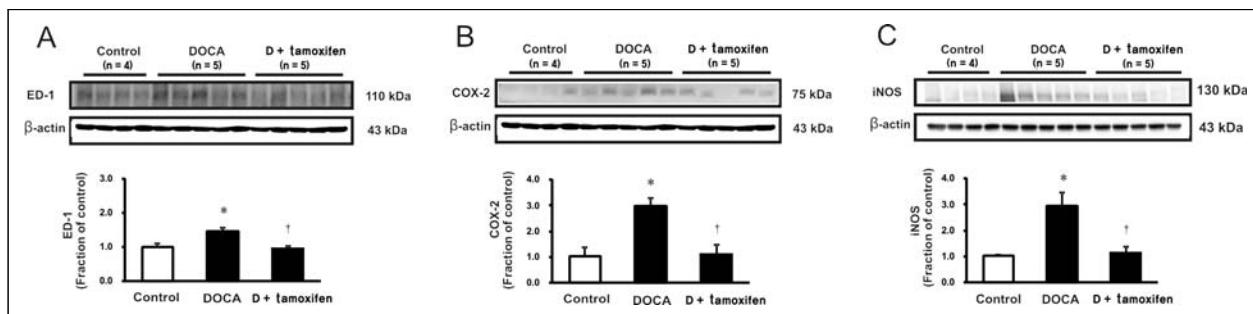


Fig. 3. Effect of tamoxifen on inflammation in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. Semiquantitative immunoblotting for ED-1, cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) proteins. * $p < 0.05$ compared to the control. † $p < 0.05$ compared to DOCA-salt hypertensive rats. DOCA, DOCA-salt hypertensive rats; D + tamoxifen, tamoxifen treated DOCA-salt hypertensive rats.

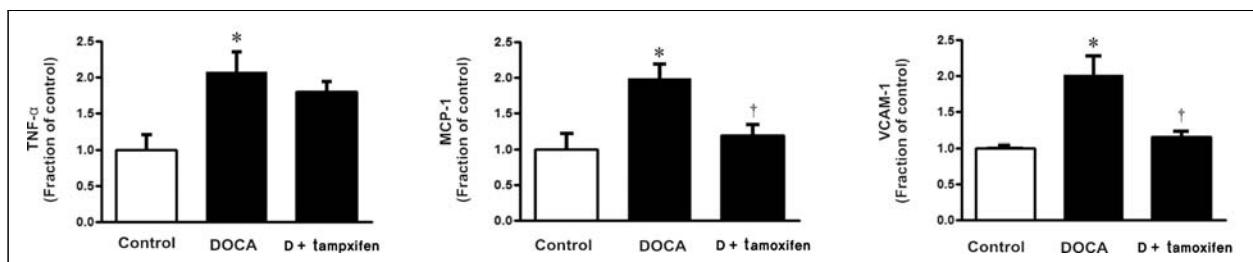


Fig. 4. mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in DOCA-salt hypertensive rats. Columns show real time polymerase chain reaction data. * $p < 0.05$ compared to the control. † $p < 0.05$ compared to DOCA-salt hypertensive rats. DOCA, DOCA-salt hypertensive rats; D + tamoxifen, tamoxifen treated DOCA-salt hypertensive rats.

활성증가를 유발하여 산화스트레스 증가, 염증 및 조직섬

유화를 일으킴이 알려져 있으며 본 연구에서도 염증 및

섬유화의 활성화가 조직손상의 주요 기전으로 작용함을 확인할 수 있었다.^{4,7,8)}

대식세포의 표지자인 ED-1이 DOCA-salt 유발 고혈압 흰쥐에서 증가, tamoxifen 투여로 호전되었다. 또한 염증 표지자인 COX-2의 단백 발현이 DOCA-salt 고혈압군에서 현저히 증가되었으며, 이는 tamoxifen 투여로 호전되었다. 신손상 염증반응에 중요한 역할을 한다고 잘 알려진 COX-2뿐만 아니라, 산화 질소계도 여러 스트레스한 상황에서 유도되며 다양한 신장질환의 병태생리에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{19,20)} DOCA-salt 고혈압군에서 증가된 iNOS의 단백 발현이 tamoxifen 투여로 호전됨을 확인하였다. 이러한 사실들은 tamoxifen이 DOCA-salt 의해 유발된 신장의 염증반응을 완화시키고 이로 인한 신장손상을 차단할 수 있음을 시사한다.

섬유화는 원인에 관계없이 모든 비가역적인 진행을 하는 신장질환의 공통된 병인 경로로 세뇨간질 부위의 섬유화 정도가 신장기능의 감소 정도를 결정한다.⁵⁾ TGF- β 는 섬유아세포의 분화를 유도하는 다기능 사이토카인으로서, 당뇨병성 신장 병증이나 고혈압성 신장 병증에서 섬유화의 진행에 관여하는 핵심 중개요소로 잘 알려져 있다.^{21,22)} TGF- β 는 하부조절인자인 Smad에 작용하여 평활근세포의 증식, 세포와 기질 단백질의 자극 및 분해 저하를 통하여 섬유화를 촉진시키는 작용을 나타낸다.^{23,24)} 본 연구에서는 tamoxifen의 치료가 DOCA-salt 고혈압 유발 흰쥐에서 Smad 단백 발현의 변화를 완화시킴을 확인하였으며 TGF- β 에 의해 유발된 평활근세포 증식의 이른 표지자로 사용되는 α -SMA의 감소 또한 확인할 수 있었다. 이와 같은 관찰결과들은 tamoxifen의 치료가 신장 섬유화의 진행을 억제함을 시사하는 소견이라 할 수 있겠다.

Tamoxifen은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM)로서 에스트로겐 작용제 및 길항제의 효능을 동시에 갖는 특징으로 유방암의 치료에 널리 사용되고 있는 약제이다. 이외에도 혈관신생 억제, 항섬유화, 항경화 효과가 있다고 알려져 있어 경화성 피막성 복막염(sclerosing encapsulating peritonitis), 테스모이드 종양(desmoids tumor) 및 Riedel's disease의 치

료제로도 사용되고 있다.^{11,25,26)} 이들 질환에서 tamoxifen은 병태생리학적 기전에 원인이 되는 지방단백의 산화를 억제하고, 섬유아세포의 활성과 섬유화를 조절하는 TGF- β 의 생성을 변화시켰다.²⁷⁾ Tamoxifen에 의한 치료적 효과는 일부 신장질환에서도 연구가 이뤄지고 있다. Delle 등¹⁵⁾은 L-NAME에 의해 유발된 고혈압성 신장 병증 모델에서 tamoxifen의 투여가 사구체 경화와 신장간질의 섬유화를 억제함을 보고하였다. 이 연구에서는 대식세포와 T세포의 신장 내 침윤에는 tamoxifen이 미치는 영향이 미미하였다. 하지만 또 다른 SERM 제제인 raloxifen을 투여한 연구에서는 raloxifen의 투여가 염증조절복합체(inflammasome)의 활성을 억제함을 보고하여 SERM 제제에서의 합염증 효과를 증명하였다.²⁸⁾ 본 연구에서는 tamoxifen이 DOCA-salt 고혈압에 유발된 신장손상에서 항염증 및 항 섬유화 작용을 통하여 신장 병증의 진행을 억제할 수 있는 가능성이 있음을 보여주었다.

본 연구에서는 tamoxifen의 항 염증 및 항 섬유화 기전을 사용하였으나 이는 Western blot과 reverse transcription PCR (RT-PCR)을 통하여 확인하였으며 조직검사를 통해 확인하지는 못하였다. 따라서 tamoxifen의 신장 병증 진행에 대한 완화 효과는 병리학적 검사를 통해 확인된 것이 아니므로 결과 해석에 주의가 필요하겠다. 그러나 조직을 분석하여 시행한 Western blot과 RT-PCR에서의 결과들을 토대로 고혈압성 신장 병증 모델에서 tamoxifen의 효과에 대해서는 유추해 볼 수 있겠다.

본 연구결과를 요약하면 고혈압성 신장병증 모델에서 염증반응의 증가와 섬유화와 관련된 인자의 증가를 확인하였으며 tamoxifen 치료가 신장병증의 완화를 유도할 가능성을 확인하였다. 그 원인 기전에는 염증반응 및 섬유화 진행의 억제효과에 기인하는 것으로 보인다.

요약

연구배경: 본 연구에서는 DOCA-salt 유발 고혈압 흰쥐 모델에서 tamoxifen의 신장 보호효과 및 병인 기전을 규명하고자 하였다.

방법: Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 모든 쥐는 편측 신장 절제를 시행 받았다. 일주일 후 고혈압군은 DOCA strip (200 mg/kg)을 피하 삽입하였으며(n = 8), 고혈압-tamoxifen 치료군은 DOCA strip을 피하 삽입 후 tamoxifen (10 mg/kg) 경구 주입을 통해 치료하였다(n = 8). DOCA strip을 삽입하지 않은 쥐들이 정상 대조군으로 사용되었다(n = 6). 2주간의 치료 후 모든 쥐의 혈압 측정을 하였으며 이후 희생하여 신장을 적출 immunoblotting 및 real-time polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다.

결과: DOCA-salt 고혈압 흰쥐 모델에서 혈압의 상승이 관찰되었으며 tamoxifen 치료는 혈압에는 영향을 주지 않았다. Transforming growth factor- β (TGF- β), Smad 2/3, Smad 4, α -smooth muscle actin, ED-1, cyclooxygenase-2, 그리고 inducible nitric oxide synthase의 단백 발현이 DOCA-salt 고혈압군에서 상승하였으며 TGF- β 를 제외한 나머지 인자의 단백 발현은 tamoxifen 치료에 의해 완화되었다. Real-time PCR을 시행하여 tumor necrosis factor- α , monocyte chemotactic protein-1, 그리고 vascular cell adhesion molecule-1의 mRNA 발현을 측정하였으며 DOCA-salt 고혈압군에서 상승과 tamoxifen 치료에 의한 완화를 확인하였다.

결론: 이 실험을 통해 tamoxifen 치료가 DOCA-salt 고혈압 흰쥐에서 신장 병증의 진행을 완화시킴을 확인하였으며 이는 tamoxifen의 항 염증 및 항 섬유화 기전과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Conflict of interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

감사의 글

이 연구는 2012년 대한고혈압학회 학술연구비 지원으로 이루어졌다.

References

- Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2275-84.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;59:251-87.
- Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Kim SW. Rosiglitazone prevents the progression of renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2010;33:255-62.
- Bae EH, Kim IJ, Park JW, Ma SK, Lee JU, Kim SW. Renoprotective effect of rosuvastatin in DOCA-salt hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1051-9.
- Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med*. 2004;43:9-17.
- Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Vaughan ED Jr, Koss M, Cote LJ, et al. Malignant hypertension resulting from deoxy-corticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circ Res*. 1975;36:300-9.
- Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone: interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004;17:597-603.
- Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773-81.
- Clark CP, Vanderpool D, Preskitt JT. The response of retroperitoneal fibrosis to tamoxifen. *Surgery*. 1991;109:502-6.
- Korte MR, Yo M, Betjes MG, Fieren MW, van Saase JC, Boer WH, et al. Increasing incidence of severe encapsulating peritoneal sclerosis after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:2412-4.
- Van Bommel EF, Hendriksz TR, Huiskes AW, Zeegers AG. Brief communication: tamoxifen therapy for nonmalignant retroperitoneal fibrosis. *Ann Intern Med*. 2006;144:101-6.
- Neugarten J, Acharya A, Lei J, Silbiger S. Selective estrogen receptor modulators suppress mesangial cell collagen synthesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F309-18.
- Ruffy MB, Kunnavatana SS, Koch RJ. Effects of tamoxifen on normal human dermal fibroblasts. *Arch Facial Plast Surg*. 2006;8:329-32.

14. Hu D, Hughes MA, Cherry GW. Topical tamoxifen: a potential therapeutic regime in treating excessive dermal scarring? *Br J Plast Surg.* 1998;51:462-9.
15. Delle H, Rocha JR, Cavaglieri RC, Vieira JM Jr, Malheiros DM, Noronha IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in a model of progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:37-48.
16. Bae EH, Kim IJ, Joo SY, Kim EY, Choi JS, Kim CS, et al. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2013 Feb 18 [Epub].
17. 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.
18. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, et al. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004;66:2264-78.
19. Liu Y, Tsuchihashi T, Kagiyama S, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Hypertens.* 1998;16:1165-73.
20. Sigmon DH, Newman JM, Beierwaltes WH. Angiotensin II: endothelium-derived nitric oxide interaction in conscious rats. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1675-82.
21. Murphy M, Crean J, Brazil DP, Sadlier D, Martin F, Godson C. Regulation and consequences of differential gene expression in diabetic kidney disease. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):941-5.
22. Liu Z, Huang XR, Lan HY. Smad3 mediates ANG II-induced hypertensive kidney disease in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F986-97.
23. Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int.* 2010;77:1076-85.
24. Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, et al. Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:F301-13.
25. Allaria PM, Giangrande A, Gandini E, Pisoni IB. Continuous ambulatory peritoneal dialysis and sclerosing encapsulating peritonitis: tamoxifen as a new therapeutic agent? *J Nephrol.* 1999;12:395-7.
26. Balasubramaniam G, Brown EA, Davenport A, Cairns H, Cooper B, Fan SL, et al. The Pan-Thames EPS study: treatment and outcomes of encapsulating peritoneal sclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:3209-15.
27. Ergun I, Keven K, Canbakan B, Ekmekci Y, Erbay B. Tamoxifen in the treatment of idiopathic retroperitoneal fibrosis. *Int Urol Nephrol.* 2005;37:341-3.
28. Nishi Y, Satoh M, Nagasu H, Kadoya H, Ihoriya C, Kidokoro K, et al. Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. *Kidney Int.* 2013;83:662-73.