인슐린비의존성 당뇨쥐에서 심방이뇨호르몬 농도와 mRNA 변동

계명대학교 의과대학 생리학교실

유병대·박원균·홍영수·송대규·배재훈

Alterations of Plasma Atrial Natriuretic Peptide and its mRNA in Non-insulin Dependent Diabetic Model of Rats

Byeong Dae Yoo, M.D., Won Kyun Park, M.D., Young Su Hong, M.S., Dae Kyu Song, M.D., Jae Hoon Bae, M.D.

Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, 700-712, Korea

- Abstract -

Background: Diabetes mellitus has led to change in fluid and electrolyte balance and consequently affected blood volume and blood pressure. These changes can trigger the secretion and synthesis of atrial natriuretic peptide (ANP) from both atrial and extra-atrial tissues. ANP plays an important role in the regulations of body fluid balance and blood pressure. Therefore, this study was carried out to elucidate whether or not atrial and extra-atrial synthesis of ANP is influenced in experimental non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) rats.

Methods: Neonatal rats were induced into NIDDM rats by single injection of streptozotocin (80 mg/kg). Plasma ANP level was measured by the use of radioimmunoassay method and the ANP mRNA expressions from the right atrium, left ventricle, hypothalamus and kidney were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction with [^{32}P]-dCTP at 8 weeks after injection of streptozotocin or citrate buffer.

Results: Blood glucose was more significantly increased at 2 hours after glucose loading in NIDDM rats than control rats. Plasma concentration of ANP tended to significantly increase in NIDDM rats compared with control rats. The expressions of ANP mRNA from each tissue were observed in different patterns. Right atrial ANP mRNA expression revealed non-significant increasing trend in NIDDM rats, whereas left ventricular ANP mRNA did not have difference. However, both hypothalamic and renal ANP mRNA expressions in NIDDM rats were significantly increased.

Conclusion: These results indicate that the enhanced expressions of hypothalamic and renal ANP mRNA act as an important regulator of electrolytes and body fluid volume in neonatally streptozotocin-induced NIDDM rats (J Kor Diabetes Asso 421 ~ 430, 2000).

Key Words: Plasma ANP, ANP mRNA, Streptozotocin, NIDDM rats

접수일자: 2000년 4월 18일, 통과일자: 2000년 9월 15일, 책임저자: 배재훈, 계명대학교 의과대학 생리학교실

서 론

심방이뇨호르몬(atrial natriuretic peptide; ANP)은 De Bold[1]에 의해 처음 발견된 28개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬으로, 심방의 심근세포에서 주로 합성되어 심방의 기계적 신전이나 세포외액량의 증가에 의해 순환혈액으로 분비되며, 이뇨, 나트륨뇨 배설(natriuresis) 및 혈관 평활근 이완작용이 있는 것으로 알려져 있다[2,3]. 최근의 연구에서 ANP가 심방이외의 다른 조직에서도 합성된다는 것이 알려졌다. 심실비후와 장기간의 고혈압에서 심실의 ANP 합성이 증가되어 혈압 조절에 중요한 작용을 하며[4], 그 외에도 뇌와 신장 등에서도 ANP 합성이 발견된 후 그 ANP 작용에 대한 연구가 진행 중에 있다[5,6].

ANP의 기능을 규명하고자 여러 질병 모델에서 ANP에 대한 연구가 다양하게 진행되어 왔으며, 당뇨병인 경우에 체내의 수분과 전해질의 불균형으로 체액량과 혈압에 변동이 생기고 신장에서 과도한 여과(hyperfiltration)의 결과로 요량과 나트륨의 배설이 증가하는데 이런 변동에 대해 ANP가 연관된다는 것이 제시되었지만, 대부분이 인슐린의존성 당뇨병(insulin dependent diabetes mellitus; IDDM)에 국한된 보고들이며[7~9], 인슐린비의존성 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM)에서 ANP의 기능적 조절을 파악하기 위해 연구한 보고는 드물다.

NIDDM의 특성을 갖는 실험적 모델로 소개된 신생 흰쥐에서 streptozotocin으로 유도한 당뇨쥐(neonatally streptozotocin-induced diabetic rat)는 성장이 된 후에는 NIDDM 환자와 동일한 특징으로서 포도당에 의해 유도되는 인슐린 분비의 선택적인 장애를 나타내어 널리 인정되고 있는 모델이다[10,11]. 이 모델에서는 인슐린 분비 장애가 당뇨췌장의 베타세포에서 포도당 대사의 이상으로 ATP 생성이 감소되기 때문이라고 설명되고 있다[12,13]. NIDDM과 ANP의 연관성을 임상적으로 관찰한 보고들에서 NIDDM 환자의 혈장 ANP 농도에는 변동이 없던지[14] 혹은 증가한다고 하였다[15]. 인체를 대상으로 관찰하기에 한계가 있어 시행한 동물실험에서도 대부분의 연구들[9,16,17]이 IDDM 모델에서 수행되어, 이 실험의 NIDDM 모델과 직접 비교하기가 곤란하였다. 이들 연구도 혈장 및 심장의 ANP 농도 변동이나 심장에서의 ANP 합성의 변동을 관찰하는데 국한되어[17~20] 심장이외 장기에서의 ANP 합성의 변동을 이해하는데는 어려움이 있었다.

따라서 이 연구는 신생 흰쥐에서 streptozotocin으로 유도한 NIDDM 모델의 흰쥐를 대상으로 ANP의 혈중농도의 변동과 함께, 심장, 시상하부 및 신장에서의 ANP 합성의 변동을 관찰하여, 당뇨병에서 발생될 수 있는 체액불균형에 대해 세포외액량의 조절에 중요 역할을 하는 ANP가 심장이외의 다른 장기에서도 합성단계에 어떤 변동을 통해 그 조절기능에 참여하는지를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료 및 당뇨쥐 유도

NIDDM 모델쥐(당뇨군)는 Song 등[13]의 방법과 동일하게 생후 1~2일된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐에 citrate buffer (0.05 mol/L, pH 4.3)에 녹인 streptozotocin (80 mg/kg)을 등 쪽에 피하 주사하여 유도하였다. 같은 날 streptozotocin이 없는 동량의 citrate buffer만을 피하주사한 쥐를 대조군으로 하였다. 최종 실험은 대조군 및 당뇨군에서 각각 수컷 흰쥐 5마리를 대상으로 하여 streptozotocin 혹은 citrate buffer를 피하주사한 후 8주에 실험동물을 희생시켜 관찰하였다.

2. 당부하시험(glucose tolerance test)

당뇨군이 잘 유도된 지를 보기 위해 처음 streptozotocin 혹은 citrate buffer를 투여한 후 7주에 공복시와 포도당(2 g/kg)을 피하에 주입한 후 30분 및 120분에 꼬리의 끝을 잘라 모세관혈을 채취하여 glucose oxidase법(Medisense 2, Medisense Inc., USA)으로 혈당값의 변화를 관찰하는 당부하시험을 실시하였다. 그리고 대조군과 당뇨군 사이의 체중과 일일 수분 섭취량도 기록하였다.

3. 혈장 ANP 농도 측정

혈장 ANP 농도 측정을 위해 streptozotocin을 투여

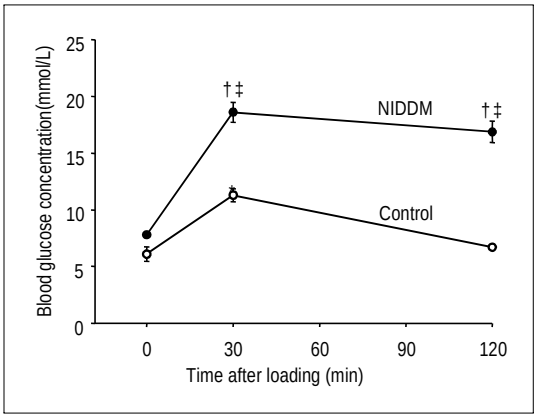

Fig. 1. Blood glucose responses to subcutaneous glucose loading (2 g/kg)in control and non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. Data are mean and standard error of five rats in each group. *p<0.05, † p<0.01 vs. before glucose loading(0 min); ‡ p<0.01 vs. control rat.

한 8주 후에 실험동물을 에테르 마취하에서 복부를 절개하고 복부 대동맥을 통해 혈액을 채취하였다. 혈액 2 mL을 4℃에 보관한 혈액보존액 (EDTA, 1 mg/mL; phenylmethyl sulphonyl fluoride, 10 mM; aprotinin, 500 KIU/mL; soybean trypsin inhibitor, 50 BAEE U/mL)과 혼합한 후 즉시 4℃에서 원심분리 (1000 x g, 5분)하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장 1 mL을 Sep Pak C18 cartridge (Waters Associates, USA)를 통과시키고 60% acetonitrile과 0.1 % trifluoroacetic acid로 유효 성분을 추출하여 건조 농축한 후 -20℃에 보관하였다가 방사면역법 (radioimmunoassay)을 이용한 ANP Kit (RPA 512, Amersham Life Science, UK)로 정량하였다.

4. ANP mRNA 발현 측정

ANP 합성단계의 변동을 파악하고자 에테르 마취하에서 복부 절개하여 복부 대동맥을 통해서 채혈한 다음, 신장을 적출하였으며 흉골정중절개로 흉곽을 개방한 후 심장을 적출하였다. 심장은 우심방과 좌심실을 분리하여 채취하였다. 빠른 시간내 실험동물의 머리를 자른 후 뇌를 적출하여 시상하부를 분리 채취하였다. 적출한 각 조직에 2 mL의 RNAzol B (TEL-TEST Inc., USA)를 넣고 Polytron (PT1200, Kinematica AG, Switzerland)으로 조직을 균질화시킨 후 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 diethyl-pyrocarbonate를 처리한 증류수에 녹여 UV spectrophotometer (DU650, Beckman, USA)로 260 nm 파장에서 RNA 농도를 측정하고, -20℃에 보관하였다가 사용하였다. 이상에 열거한 소모성 시약은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였다.

ANP mRNA 발현을 분석하기 위하여 분리한 전체 RNA로 RT Kit (Promega, USA)와 PCR Kit (Perkin-Elmer, USA)를 사용한 역전사-중합효소연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하였다. PCR에 사용한 primer는 20 pM의 ANP (sense: 5'-ATGGATCTCCAGAAGGTGCT-3'; antisense: 5'-CTGCCATCGTGGATTGTTCTG-3')와 GAPDH (sense: 5'-CTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'; antisense: 5'-ACAACCTGGTCCTCAGTGTA-3')의 두 종류를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3 μL에 10×buffer II, MgCl2, 10 mM dNTPs (dCTP의 1/2 volume은 [^{32}P]-dCTP로 대체), primer, 5 U/μL Taq polymerase와 reverse transcription product를 첨가하여 최종 20 μL가 되게 하였다. ANP 및 GAPDH의 DNA 증폭은 Thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 95℃에서 5분간 열처리한 후 95℃에서 1분간 denaturation시켰고, ANP는 55℃에서 1분간 그리고 GAPDH는 56℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 하여 ANP는 30회 그리고 GAPDH는 26회 시행한 후 72℃에서 3분간 extension 반응을 추가하였다. RT-PCR 산물은 5% acrylamide gel에서 전기영동하여, ANP는 116 base pair의 크기에서 그리고 GAPDH는 571 base pair의 크기에서 band를 확인하였다. 이를 현상 필름에 노출시켜 현상한 후 음영농도계측기 (Gel Doc 1000, Biorad, USA)를 이용하여 각 띠의 음영의 정도와 면적을 측정하였으며, ANP mRNA 발현의 값은 각각의 GAPDH mRNA 발현에 대한 비로 나타냈으며, 당뇨군의 각 장기별 ANP mRNA 발현을 해당하는 대조군의 발현에 대한 상대적인 값으로 표시하였다.

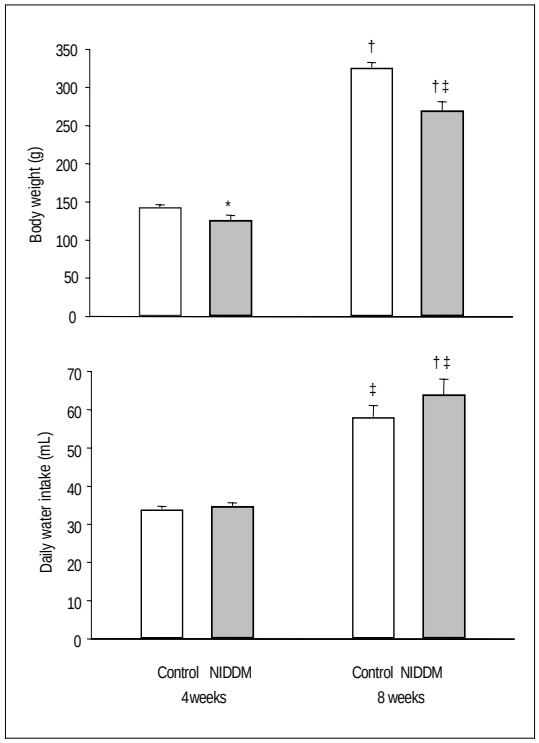

Fig. 2. Body weight(upper panel) and daily water intake (lower panel) at 4 and 8 weeks after birth of control and non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. Data are mean and standard error of five rats in each group. * $p<0.05$, † $p<0.01$ vs. control rat; ‡ $p<0.01$ vs. 4 weeks.

5. 통계학적 자료 처리

측정한 각각의 자료는 평균과 표준오차로 표시하였으며, 대조군과의 비교는 Student's t-test를 통해 유의성을 검정하였고, 통계학적 유의성은 p 값이 0.05 미만으로 정하였다.

결 과

실험일인 생후 7주에 시행한 당부하시험 (Fig. 1)에서 공복시 혈당값은 당뇨군이 7.8±0.18 mmol/L로 대조군의 6.1±0.63 mmol/L에 비해 높은 값을 보였지만 유의한 차이는 아니었다. 대조군의 혈당값은 glucose 주입 후 30분에 11.3±0.58 mmol/L로 증가 ($p<0.05$) 하였다가 주입 후 2시간에 6.7±0.19 mmol/L로 공복시 수준으로 회복되었다. 하지만 당뇨군에서는 glucose주입 후 30분에 혈당값이 18.6±0.89 mmol/L로 크게 증가 ($p<0.01$)하였으며 2시간 뒤에도 16.9±0.95 mmol/L로 계속 증가가 유지되어 대조군과 차이 ($p<0.01$)를 보임으로써 NIDDM 모델쥐가 만들어진 것을 확인할 수 있었다.

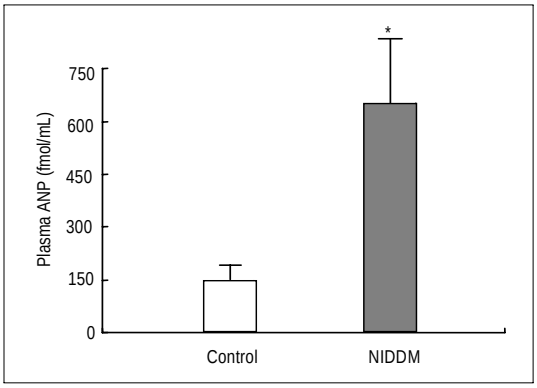

Fig. 3. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide (ANP) sampled at 8 weeks after birth in control and non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. Data are mean and standard error of five rats in each group. *$p<0.01$ vs. control rat.

수유가 끝난 생후 4주에 측정한 체중과 수분 섭취량은 대조군과 당뇨군에서 동일하였다 (Fig. 2). 최종 실험일인 8주에 측정한 체중은 생후 4주에 비해 대조군과 당뇨군에서 모두 증가 ($p<0.01$)하였지만, 생후 8주의 체중은 당뇨군이 270.0±10.99 g으로 대조군의 326.3±6.57 g에 비해 유의하게 ($p<0.01$) 성장이 억제되었다. 일일 수분 섭취량도 생후 4주에 양군에서 동일하였으며, 생후 8주에는 생후 4주에 비해 양군에서 모두 증가 ($p<0.01$)하였다. 생후 8주에 당뇨군의 일일 수분 섭취량은 유의한 차이는 아니지만 대조군에 비해 증가하는 경향이었다. 대조군에 비해 당뇨군의 체중 변화와 수분 섭취량의 변화는 일반적으로 당뇨병에서 관찰할 수 있는 소견을 보였다.

생후 8주에 채취한 혈장 ANP 농도는 당뇨군에서 652.9±177.47 fmol/mL로 대조군의 156.2±9.83 fmol/mL에 비해 유의하게 증가 ($p<0.01$)하였다 (Fig. 3).

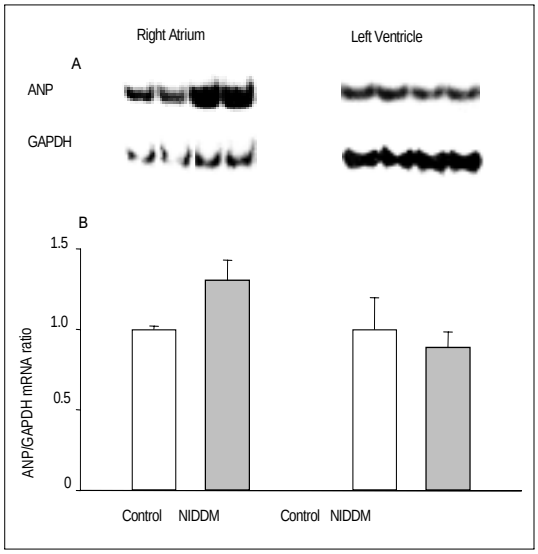

Fig. 4. ANP mRNA expression from right atrium and left ventricle in control and non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. (A) Each of two represe ntative autoradiograms from both groups. (B) The relative expression levels of ANP mRNA are mean and standard error of five rats in each group. The density of each mRNA sample for ANP was normalized to the GAPDH mRNA. The mean corrected density values of NIDDM group were further divided by those of the control group.

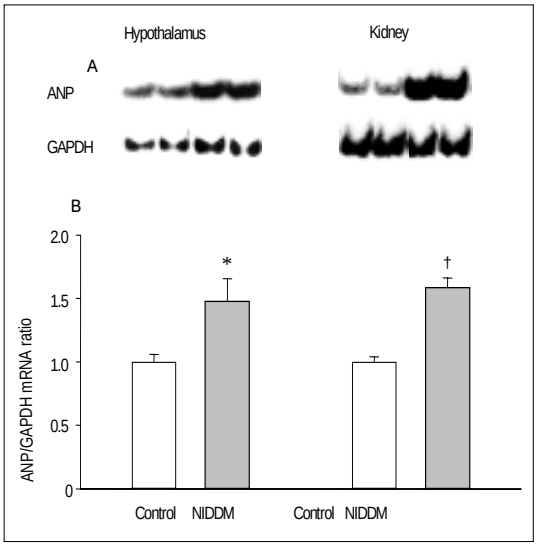

Fig. 5. ANP mRNA expression from hypothalamus and kidney in control and non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. (A) Each of two representative autoradiograms from both groups. (B) The relative expression levels ANP mRNA are mean and standard error of five rats in each group. The density of each mRNA sample for ANP was normalized to the GAPDH mRNA. The mean corrected density values of NIDDM group were further divided by those of the control group. * $p<0.05$, † $p<0.01$ vs. control rat.

ANP 합성단계의 변동을 파악하기 위해 관찰한 ANP mRNA 발현의 정도는 조직에 따라 차이가 있었다. 우심방에서는 당뇨군의 ANP mRNA 발현 정도가 대조군에 비해서 평균적으로 1.3배 정도 증가하는 경향이 있었고, 좌심실에서는 양 군 사이에 거의 동일한 값을 보였다 (Fig. 4). 반면에 시상하부에서는 당뇨군의 ANP mRNA 발현의 정도가 대조군에 비해 1.5±0.18배의 유의한 증가 ($p<0.05$)를 보였으며, 신장의 피질에서도 당뇨군이 대조군에 비해 ANP mRNA 발현이 평균 1.6±0.08배의 유의한 증가 ($p<0.01$)를 보였다 (Fig. 5).

고 찰

ANP는 이뇨, 나트륨뇨 배설 및 혈관확장의 효과를 가진 심장호르몬으로, 혈압, 체액 및 심혈관계의 항상성 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[1,21]. ANP의 합성과 분비에 중요 조절인자는 우심방의 확장이나 체액량의 증가이며, 여러 질병에서 연구되어 왔다[22,23].

최근의 보고들에서 ANP는 심방에 국한된 호르몬이 아니며, 심장비후와 장기간 고혈압의 심실에서도 ANP 합성이 증가된다는 것이 보고되었고[4], Tanaka 등[24]이 시상하부 조직에서 ANP 농도를 최초로 측정한 이후, 이 ANP가 시상하부의 자발적인 신경 활동성을 변동시키며 중추적으로 신경전달물질 혹은 신경매개물질로 renin-angiotensin-aldosterone계 및 항이뇨호르몬계의 조절에 영향을 미쳐 체액량과 혈압의 조절에 역할을 한다고 소개되면서[5] ANP의 중추적 기능에 많은 관심이 모이고 있다. 그리고 ANP의 최종 표적장기중

의 하나인 신장에서도 혈액중의 나트륨 농도와 체액량의 증가에 대해 자체적으로 ANP를 합성 분비하여, 심장에서의 합성과 구별되는 독자적 역할이 있다는 보고도 있다[25]. 이 실험에서는 전해질과 체액량의 변동이 초래될 수 있는 당뇨병, 특히 지금까지 연구가 비교적 적었던 NIDDM 모델을 신생 흰쥐에서 streptozotocin으로 유도한 후 심방이외의 심실과 시상하부 및 신장에서 ANP 합성의 변동을 종합적으로 파악하였다.

이 실험에 이용한 신생 흰쥐에 streptozotocin을 투여하여 만든 NIDDM 모델은 성장이 된 흰쥐에 동일 약물을 투여하여 만드는 IDDM 모델과는 차이가 있다. IDDM 모델에서는 이 약물에 의해 즉시 췌장이 거의 대부분 파괴되어, 약물 투여 후 1~2일에 급격한 혈당 상승이 생긴다[7,26]. 하지만 신생 흰쥐에서 유도한 NIDDM 모델에서는 처음 streptozotocin 주입 후 초기와 어린 쥐에서는 급성 당뇨병이 유발되지만, 차츰 췌장 베타세포의 재생이 일어나 성장이 된 후에는 사람의 NIDDM에서와 같이 특징적인 포도당에 의한 인슐린 분비의 선택적인 장애가 발생된다고 보고되고 있다[27,28]. 이 실험에서도 당뇨군에서 대조군에 비해 성장억제와 수분 섭취량 증가의 변동을 보여 당뇨병에서 일반적으로 관찰되는 유사한 소견을 나타내었다. 그리고 당부하시험에서 2시간의 혈당치가 매우 증가되어 유지되면서 대조군과 유의한 차이를 보였다. 또한 최근에 저자들은[13] 이번 실험과 동일한 방법으로 NIDDM 당뇨모델 쥐를 유도한 후 공복시 혈청 insulin 농도를 측정하였던 바, insulin 농도가 대조쥐 (1.03±0.327 ng/mL)와 NIDDM쥐 (0.96±0.495 ng/mL) 사이에 차이가 없음을 확인하여 이번 실험에 이용한 NIDDM쥐 유도 방법에 의해 NIDDM 모델이 잘 확립된 것으로 생각된다. 마지막으로 NIDDM쥐에서 획득한 췌장 소도에서도 포도당 (11.1 mmol/L)을 투여한 후 인슐린 분비능이 유의하게 감소되는 것을 확인한 바 있다[13].

임상적인 당뇨병 혹은 실험적으로 유도된 당뇨병 모델에서 사구체 여과율의 증가, 과도한 여과가 생기는데, 그 자세한 발생 기전은 완전히 이해되어 있지 않지만 당뇨병에서 신장의 혈역학이 변하면서 그것이 나트륨과 체액량의 변동과 연관된 것으로 생각하고 있다[29]. 당뇨병과 세포외액량의 변화를 조사한 연구에서 실제로 당뇨병 환자[30]뿐만 아니라 실험동물[18,29,31]에서 세포외액량의 증가와 혈장 ANP 농도의 증가를 관찰하였고, 이 둘 사이에 연관성이 있다고 보고하였다. 그리고 당뇨병에서 생기는 신장의 과도한 여과에 ANP가 관련된다는 것을 증명하기 위해 streptozotocin으로 유도한 당뇨 쥐에 ANP 항혈청[7]과 ANP 수용체의 길항제[32]를 주입한 결과 사구체 여과율의 유의한 감소를 증명한 결과도 있다. 따라서 이번 실험에서 세포외액량과 사구체 여과율을 직접 측정하지는 않았지만, 위에서 제시한 여러 연구결과를 토대로 당뇨 쥐에서 생긴 나트륨과 체액량의 변동이 심장에서의 ANP 분비를 자극할 수 있으며 ANP의 합성에도 영향을 미칠 수 있을 것이라 생각된다.

현재까지 당뇨병과 ANP와의 연관성과 ANP의 역할을 파악하기 위한 많은 연구가 진행중에 있는데, 거의 모든 연구들이 IDDM 모델을 대상으로 관찰하였다. IDDM 모델에서의 공통된 특징중의 하나는 혈장 ANP 농도의 유의한 증가였다[6~9,17]. 하지만 NIDDM 환자의 혈장 ANP 농도는 변동이 없던지[14,15] 오히려 감소한다는 보고를 하였다[31]. 혈장 ANP 농도가 감소한다는 Chattington 등[33]의 보고는 관찰 대상이 최근에 발병한 NIDDM 환자로 이 실험과 시기적으로 직접 비교하기에는 어려움이 있다. 이 실험에서 당뇨군의 혈장 ANP 농도가 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었는데, 이 결과는 특발성 NIDDM 쥐에서 혈장 ANP 농도가 증가한다는 보고[34]와 일치되는 소견으로, NIDDM에 의해 생긴 체액량의 증가에 대해 ANP의 작용을 통해 이뇨 및 나트륨뇨 배설을 증진시키기 위한 현상이라 생각된다[17]. 하지만 같은 당뇨병 모델에서도 미세단백뇨의 출현[35]이나 고혈압의 유무[36]에 따라 혈장 ANP 농도의 변동에 차이가 생길 수 있으므로 향후 연구에 고려되어야 할 대상이라 생각된다.

ANP 합성의 변동을 보기 위해 관찰한 ANP mRNA 발현의 정도는 각 장기별로 차이를 보였다. 먼저, 당뇨군에서 우심방의 ANP mRNA 발현은 유의하지 않지만 증가하는 경향을 보인 반면에 좌심실에서는 아무런 차이가 없었다. 우심방의 ANP 합성 및 분비의 가장 잘 알려진 자극은 우심방의 신전으로 알려져 있

다[3]. 당뇨쥐를 대상으로 심장의 ANP mRNA 변동을 관찰한 다음의 보고들도 혈장 ANP 농도와 같이 IDDM 모델이 대부분이었다. IDDM 쥐에서 우심방의 ANP mRNA 발현은 변동이 없던지[17,18] 혹은 감소한다고 하며[6], 좌심실의 ANP mRNA 발현은 위의 보고들에서 모두 증가하였다. 이런 결과들은 이 실험의 결과와 상반되는 소견으로 당뇨병의 유형이 다른데서 오는 결과인지에 대해서는 현재로서는 확실하지 않다. 하지만 혈액량의 증가에 의해 심장 즉 심방과 심실의 ANP 분비가 모두 ANP 합성과 비례관계가 있게 증가되며, 특히 혈압(심장 후부하)의 증가가 심방보다는 심실에서 ANP 분비에 더 큰 변동을 초래한다는 사실에 기초한다면[17,18,37], 최소한 이 실험에 이용된 8주된 NIDDM 쥐에서는 IDDM 쥐와는 달리 큰 혈압의 변동이 생기지 않아 좌심실의 ANP mRNA에 차이를 나타내지 못했던 것으로 생각된다. 아울러 IDDM 쥐에서는 ANP mRNA 발현의 주된 장소는 심방이 아니라 심실이다[18]. 하지만 특발성 NIDDM 쥐에서는 심실의 신전이 혈장 ANP 농도에 영향을 주는 주요 조절인자가 아니고 차라리 혈액 및 혈장량의 증가로 인한 심방의 신전이 이 당뇨 모델 쥐에서 ANP 분비를 증가시키는데 주 매개체가 된다는 사실이 이 실험 결과를 뒷받침한다고 사료된다[34].

체액량과 삼투질 농도의 조절 중추인 시상하부에서도 ANP가 존재하며 합성된다는 것이 알려진 후로[24,38], ANP의 중추적 역할을 파악하기 위한 실험이 진행되었다. 시상하부에서 면역반응성 ANP가 발견되었으며[24], Haskins 등[5]은 시상하부의 ANP가 혈액량과 삼투질 농도 조절에 관여하는 시상하부 신경의 활동성을 억제시키며 심혈관계의 중추적 조절 기전에 관여할 것이라 제안하였다. 시상하부의 ANP는 안정상태의 항이뇨호르몬 분비뿐만 아니라 출혈 혹은 탈수에 의해 유도되는 항이뇨호르몬의 분비도 감소시키는 작용이 있으며[39], 3일간의 탈수로 쥐의 시상하부 ANP 농도가 증가됨을 확인하였다[5]. 그리고 뇌의 ANP가 신장을 통한 전해질 배설에는 무관하며[40], 수분 섭취와 체액량 균형에 관여하면서 뇌의 angiotensin II와 연관된 조절 기전에 길항적인 영향을 준다는 것이 알려졌다[41]. 따라서 이 실험에서 관찰된 시상하부 ANP mRNA 발현의 유의한 증가는 신장에 대한 직접적인 배설 기능의 조절 작용보다는 뇌의 항이뇨호르몬과 angiotensin II에 대한 길항적 억제 조절을 통해 체액량과 삼투질 농도의 항상성유지를 위해 중추적으로 작용한 결과로 생각된다.

당뇨쥐에서 처음으로 신장 ANP mRNA 변동을 관찰한 보고[6]에서 신장의 ANP mRNA 발현의 정도가 너무 낮아 Northern blot analysis로는 검출하지 못하였고 이 실험과 같이 RT-PCR로 당뇨쥐에서 유의한 신장의 ANP 발현 증가를 확인할 수 있었다. 신장도 역시 심방이외의 ANP 합성 장소이며[42], 신장에서 합성된 ANP가 국소적으로 신장의 나트륨 배설을 조절한다고 하였다[43]. 당뇨병 환자에서도 신장에서 합성된 ANP (urodilantin)가 신장의 나트륨 배설정도와 밀접한 관계가 있다고 하였다[44]. 이 보고들은 순환중인 혈장 ANP가 신장의 나트륨 배설에 관여하지만 그 외에도 신장 그 자체가 당뇨병에 의해 생긴 체액과 전해질의 불균형을 감지하고 조절하여 나트륨과 수분의 항상성 조절에 관여한다고 하였다[6].

결론적으로 NIDDM 쥐에서 초래된 혈액량과 나트륨의 증가로 심방이 확장되어 우심방의 ANP 합성이 증가되면서 혈장 ANP의 증가를 보였으며, 아울러 심방이외에 시상하부 및 신장의 피질에서도 ANP 합성의 증가를 통해 세포외액량과 전해질 균형 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 신생 흰쥐에서 streptozotocin (STZ)으로 유도한 인슐린 비의존성 당뇨병 (NIDDM) 모델의 흰쥐를 대상으로 ANP의 혈중 농도의 변동과 심장, 시상하부 및 신장의 ANP 합성의 변동을 관찰하여, 당뇨병에서 발생될 수 있는 체액 및 전해질 불균형에 대한 ANP의 조절기능을 규명하고자 하였다.

방법: NIDDM 쥐(당뇨군)는 생후 1~2일된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐에 citrate buffer에 녹인 STZ (80 mg/kg)을 등 쪽에 피하 주사하여 유도하였다. 같은 날 STZ이 없는 동량의 citrate buffer만을 투여한 쥐를 대조군으로 하였다. 혈장 ANP 농도는 STZ을 투여한 8주 후에 대동맥을 통해 채혈한 뒤 방사면역법으

로 측정하였다. ANP 합성단계의 변동을 파악하고자 우심방, 좌심실, 시상하부 및 신장의 피질부위를 채취하여 [^{32}P]-dCTP를 이용한 역전사-중합효소연쇄반응을 시행하여 ANP mRNA의 변동을 관찰하였다.

결과: 생후 7주에 시행한 당부하시험에서 공복시 혈당치는 당뇨군과 대조군사이에 차이가 없었고, 당뇨군에서는 glucose주입 후 30분에 혈당치가 크게 증가하였으며 2시간 뒤에도 계속 증가하여 유지되었다. 생후 8주에 당뇨군이 대조군에 비해 체중은 약간 감소, 수분 섭취량은 증가하는 경향이 있었다. 혈장 ANP 농도는 당뇨군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. ANP mRNA 발현의 정도는 조직에 따라 차이가 있었다. 당뇨군의 ANP mRNA 발현은 대조군에 비해서, 우심방에서는 약간 증가하는 경향이 있었고, 좌심실에서는 양군사이에 거의 동일한 값을 보였다. 반면에 시상하부와 신장의 피질에서는 당뇨군이 대조군에 비해 ANP mRNA 발현이 유의하게 증가하였다.

결론: 신생 흰쥐에 streptozotocin으로 유도한 NIDDM 모델에서 관찰한 ANP mRNA 변동의 결과로 보아, ANP가 이미 알려진 심방이외 신장 및 시상하부에서 ANP 합성의 증가를 통해 NIDDM에서 세포외액량과 전해질 균형의 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. De Bold AJ: *Heart atrial granularity effects of changes in water electrolyte balance. Proc Soc Exp Biol Med 161:508-11, 1979*
2. Goetz KL: *Physiology and pathophysiology of atrial peptides. Am J Physiol 254:E1-15, 1988*
3. Ruskoaho H: *Atrial natriuretic peptide; Synthesis, release, and metabolism. Pharmacol Rev 44:479-602, 1992*
4. Kawakami H, Okayama H, Hamada M, Hiwada K: *Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. Clin Sci 90:197-204, 1996*
5. Haskins JT, Zingaro GJ, Lappe RW: *Rat artriopeptin III alters hypothalamic neuronal activity. Neurosci Lett 67:279-84, 1986*
6. Shin SJ, Lee YJ, Tan MS, Hsieh TJ, Tsai JH: *Increased atrial natriuretic peptide mRNA expression in the kidney of diabetic rats. Kidney Int 51:1100-5, 1997*
7. Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM: *Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats: Potential mediator of hyperfiltration. J Clin Invest 80:670-4, 1987*
8. Perico N, Benigni A, Gabanelli M, Piccinelli A, Rog M, Riva CD, Remuzzi G: *Atrial natriuretic peptide and prostacyclin synergistically mediate hyperfiltration and hyperperfusion of diabetic rats. Diabetes 41:533-8, 1992*
9. Hirata Y, Suzuki Y, Hayakawa H, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kangawa K, Matsuo H, Omata M: *Participation of endogenous atrial natriuretic peptide in the regulation of urinary protein excretion in experimental diabetic rats. Clin Sci 88:413-9, 1995*
10. Ward WK, Beard JC, Halter JB, Pfeiffer MA, Porte D: *Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes Care 7:491-502, 1984*
11. Tsuji K, Taminato T, Usami M, Ishida H, Kitano M, Fukumoto H, Koh G, Kurose T, Yamada Y, Yano H, Seino Y, Imura H: *Characteristic feature of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. Metabolism 37:1040-4, 1988*
12. Song DK, Park WK, Bae JH, Park MK, Kim SJ, Ho WK, Earm YE: *Reduced dihydroxyacetone sensitivity and normal sensitivity to glyceraldehyde and oxidizing agent of ATP-sensitive K^+ channels of pancreatic beta cells in NIDDM rats. J Kor Med Sci*

12:286-92, 1997

13. Song DK, Ahn YH, Bae JH, Park WK, Hong YS, Ho WK, Earm YE: *Evidences of enhancement of malate-aspartate shuttle activity in beta cells of streptozotocin-induced NIDDM rats. Metabolism 49:92-6, 2000*
14. Ferri C, De Mattia G, Piccoli A, Santucci A, Laurenti O, Balsano F, Bellini C: *Atrial natriuretic factor in hypertensive diabetic patients. Diabetes Care 17:195-200, 1994*
15. Shinoda T, Ishihara M, Kurimoto E, Aizawa T, Hiramatsu K, Shirota T, TaKasu N, Yamada T: *Elevated plasma atrial natriuretic peptide level in the early phase of microalbuminuria in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Clin Nephrol 34:202-7, 1990*
16. Sechi LA, Valentin JP, Griffin CA, Lee E, Bartoli E, Humphreys MH, Schambelan M: *Receptors for atrial natriuretic peptide are decreased in the kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. J Clin Invest 95:2451-7, 1995*
17. Wu SQ, Kwan CY, Tang F: *Streptozotocin-induced diabetes has differential effects on atrial natriuretic peptide synthesis in the rat atrium and ventricle: A study by solution-hybridization-RNase protection assay. Diabetologia 41:660-5, 1998*
18. Matsubara H, Mori Y, Yamamoto J, Inada M: *Diabetes-induced alterations in atrial natriuretic peptide gene expression in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Circ Res 67:803-13, 1990*
19. Todd ME, Hebden RA, Gowen B, Tang C, McNeill JH: *Atrial structure and plasma ANF levels in rats with chronic diabetes mellitus. Diabetes 39:483-9, 1990*
20. Yano S, Tanigawa K, Suzuki S, Kobayashi Y, Shimada T, Morioka S, Kato Y, Moriyama K: *Effect of diabetes mellitus on levels of atrial natriuretic hormone in plasma and the right atrium in the non-obese diabetic mouse. Acta Endocrinol 124:595-601, 1991*
21. Arai H, Nakao K, Saito Y, Morii N, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Mukoyama M, Ohkubo H, Nakanishi S, Imura H: *Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone. Circ Res 62: 926-30, 1988*
22. Anderson JV, Christofides ND, Blood SR: *Plasma release of atrial natriuretic peptide in response to blood volume loading. J Endocrinol 109:9-13, 1986*
23. Wong NL, Wong EF: *Increased release of atrial natriuretic peptide by the atria of rats with experimental renal failure. Nephron 57:89-93, 1991*
24. Tanaka I, Misono KS, Inagami T: *Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: Determination by specific radioimmunoassay. Biochem Biophys Res Commun 124:663-8, 1984*
25. Shin SJ, Wen JD, Chen IH, Lai FJ, Hsieh MC, Hsieh TJ, Tan MS, Tsai JH: *Increased renal ANP synthesis, but decreased or unchanged cardiac ANP synthesis in water-deprived and salt-restricted rats. Kidney Int 54:1617-25, 1998*
26. Benigni A, Perico N, Dadan J, Gabanelli M, Galbusera M, Boccardo P, Mennini T, Remuzzi G: *Functional implications of decreased renal cortical atrial natriuretic peptide binding in experimental diabetes. Circ Res 66:1453-60, 1990*
27. Kergoat M, Bailbe D, Portha B: *Insulin treatment improves glucose-induced insulin release in rats with NIDDM induced by streptozotocin. Diabetes 36:971-7, 1987*
28. Tsuura Y, Ishida H, Okamoto Y, Tsuji K, Kurose T, Horie M, Imura H, Okada Y, Seino

Y: *Impaired glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β-cells in streptozotocin-induced NIDDM rats. Diabetes 41:861-5, 1992*

29. Allen TJ, Cooper ME, O'Brien RC, Bach LA, Jackson B, Jerum G: *Glomerular filtration rate in streptozotocin-induced diabetic rats. Role of exchangeable sodium, vasoactive hormones, and insulin therapy. Diabetes 39:1182-90, 1990*
30. Tanabe A, Naruse M, Wasada T, Naruse K, Yoshimoto T, Omori Y, Demura H: *Effects of acute hyperinsulinemia on plasma atrial and brain natriuretic peptide concentration. Eur J Endocrinol 132:693-8, 1995*
31. Hebden RA, Todd ME, McNeill JH: *Relationship between atrial granularity and release of atrial natriuretic factor in rats with diabetes mellitus. Am J Physiol 257:R932-8, 1989*
32. Sakamoto K, Kikkawa R, Haneda M, Shigeta Y: *Prevention of glomerular hyperfiltration in rats with streptozotocin-induced diabetes by an atrial natriuretic peptide receptor antagonist. Diabetologia 38:536-42, 1995*
33. Chattington PD, Anderson JV, Rees LH, Leese GP, Peters JR, Vora JP: *Atrial natriuretic peptide in type 2 diabetes mellitus: Response to a physiological mixed meal and relationship to renal function. Diabet Med 15:375-9, 1998*
34. Vesely DL, Gower Jr WR, Dietz JR, Overton RM, Clark LC, Antwi EK, Farese RV: *Elevated atrial natriuretic peptides and early renal failure in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Metabolism 48:771-8, 1999*
35. Yano Y, Katsuki A, Gabazza EC, Ito K, Fuji M, Furuta M, Tuchihashi K, Goto H, Nakatani K, Hori Y, Sumida Y, Adachi Y: *Plasma brain natriuretic peptide levels in normotensive noninsulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria, J Clin Endocrinol Metab 84:2353-6, 1999*
36. Chan JC, Cheung CK, Cockram C, Critchley JA, Swaminathan R, Law LK, Nicholls MG: *Atrial natriuretic peptide and renin-angiotensin- aldosterone system in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Human Hyperten 8:451-6, 1994*
37. Hong M, Jin Y, Mai YQ, Han KK: *The effects of salt loading and dehydration on atrial natriuretic peptide(ANP) gene expression. Comp Biochem Physiol 97:B205-8, 1990*
38. Tanaka I, Inagami T: *Release of immunoreactive atrial natriuretic factor from rat hypothalamus in vitro. Eur J Pharmacol 122:353-5, 1986*
39. Samson WK: *Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. Neuroendocrinology 40:227-9, 1985*
40. Nakao K, Morii N, Itoh H, Yamada T, Shiono S, Sugawara A, Saito Y, Mukoyama M, Arai H, Sakamoto M, Imura H: *Atrial natriuretic polypeptide in the brain: Implication of central cardiovascular control. J Hypertens 4:S492-6, 1986*
41. Geiger H, Bahner U, Kraus I, Hoffmann M, Palkovits M, Heidland A, Luft FC: *Effect of ACE inhibitors on atrial natriuretic factor in the brains of rats with reduced renal mass. Kidney Int 44:24-9, 1993*
42. Ritter D, Needleman P, Greenwald JE: *Synthesis and secretion of an atriopeptin-like protein in rat kidney cell culture. J Clin Invest 87:208-12, 1991*
43. Greenwald JE, Needleman P, Wikins M, Schreiner GF: *Renal synthesis of atriopeptin-like protein in physiology and pathophysiology. Am J Physiol 260:F602-7, 1991*
44. Goetz KL, Drummer C, Zhu JL, Leadley RJ, Fiedler F, Gerzer R: *Evidence that urodilantin, rather than ANP, regulates renal sodium excretion. J Am Soc Nephrol 1:867-74, 1990*