

만성신부전 쥐에서 심방 및 심방외 조직 ANP mRNA의 발현

제명대학교 의과대학 생리학교실, 신장연구소

이원기 · 박원균 · 홍영수 · 송대규 · 배재훈

〈요약〉

실험적으로 만성신부전 쥐를 유도한 다음 비교적 장시간의 관찰을 통해 신장 실질의 감소에 따른 신장기능 저하에 대해 신장기능을 향상시키는 보상적 조절을 있다고 알려진 atrial natriuretic peptide(ANP) 기능을 혈장 ANP 농도와 심방 및 심방외 조직에서 ANP 합성 단계의 변동을 측정하여 파악하고자 하였다.

실험은 Sprague-Dawley종 숫쥐를 대상으로 sham 수술 쥐와 만성신부전 쥐(CRF 쥐)로 나누었다. CRF 쥐는 좌측 신장을 2/3 결찰하고 1주일 후에 우측 신절제술을 시행하여 전체 신장의 5/6를 제거하였으며, 최종 수술 후 8주(CRF 8주 쥐)와 12주(CRF 12주 쥐)로 나누어 결과를 관찰하였다. 혈장 ANP 농도는 방사면역법으로 정량하였다. 각 조직에서 ANP 합성단계의 변동을 보기 위해 동위원소를 사용한 역전사-증합효소연쇄반응을 통해 ANP mRNA 발현을 비교하였다.

혈청 요소 질소 농도는 CRF 쥐에서 sham 쥐에 비해 유의하게 증가되었으며, CRF 8주 쥐에 비해 12주 쥐의 값이 더 증가하였다. 체중의 증가율은 CRF 쥐가 sham 쥐에 비해 평균 증가율이 낮았다. 혈장 ANP 농도는 CRF 쥐에서 평균적으로 증가하였지만 유의성은 없었다. ANP mRNA 발현의 정도는 각 조직에 따라 상이하였다. 우심방에서는 CRF 쥐에서 mRNA 발현에 변화가 없었지만, 좌심실에서는 ANP mRNA 발현이 유의하게 증가하였다. 신장의 ANP mRNA 발현도 만성신부전 쥐에서 sham 쥐에 비해 1.5배 증가하는 경향이었다. 그러나 시상하부의 ANP mRNA는 sham 쥐에 비해 CRF 8주 쥐에서 발현이 약간 감소하였으나, CRF 12주 쥐에서는 50% 정도로 유의하게 감소하였다. 혈청 요소 질소 농도와 각 조직 ANP mRNA 발현 사이의 상관관계에서 혈청 요소 질소에 대해 좌심실과 신장에서는 유의한 직선 정비례관계를, 시상하부에서는 유의한 직선 반비례관계가 있었다. 그리고 혈장 ANP 농도에 대한 각 조직의 ANP mRNA의 상관관계에서 우심방과 신장에서 유의한 직선 정비례관계를 관찰하였다.

이상의 결과로 만성신부전 실험쥐에서 심장, 신장 및 시상하부의 ANP mRNA 발현의 조절은 독자적으로 이루어짐을 알 수 있었고, 만성신부전으로 생기는 신장기능과 체액량의 변동에 대한 보상적 반응에 각 조직의 ANP가 다른 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

서 론

만성신부전을 유도하는 여러 방법들 중에서 신장의

실질조직의 크기를 줄여 남아있는 신원에 작업량을 증가시킴으로써 점진적으로 신손상을 유발하고, 장시간

의 관찰을 통해 종국적으로 만성신부전을 유도하는 동

물 실험의 모형으로 부분 신절제술이 이용되고 있다¹⁾.

이런 원리를 이용한 부분 신절제술 중에서 신장 전체

의 5/6을 절제하는 방법이 만성신부전의 모형으로 가

장 많이 이용되고 있다^{2, 3)}.

책임저자 : 배재훈 대구시 중구 동산동 194

제명대학교 의과대학 생리학교실

Tel : 053)250-7452, Fax : 053)250-7454

E-mail : jhbae@dsmc.co.kr

이 방법으로 유도된 만성신부전 모형의 실험동물에서는 신장의 크기 감소로 신장의 부담이 증가된다. 신장크기의 감소에 대한 보상작용으로 남아있는 신원의 사구체여과율이 향상되지만, 배설되는 전체 나트륨량이 감소되므로 체액량이 증가되고 고혈압이 발생된다⁴⁾. 지나친 체액량의 증가에 대해 보상작용으로 신세뇨관에서 나트륨과 수분의 재흡수가 감소하고 배설이 촉진되는 현상이 생긴다고 알려져 있다⁵⁾. 이런 신장의 보상적 배설기능 향상과 고혈압을 억제하는 작용에 심방이뇨호르몬(atrial natriuretic peptide, ANP)이 중요한 역할을 담당한다는 보고가 있다^{6, 7)}.

ANP는 처음에 심방의 심근세포에서 합성되어 분비된다는 것이 발견되었으며⁸⁾, 심방의 기계적 신전이나 세포외액량의 증가에 의해 순환혈액으로 분비되어, 강력한 이뇨, 나트륨뇨 및 혈압하강의 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾.

현재까지 대부분의 연구는 실험적으로 만성신부전의 동물모형을 만든 후 비교적 단기간에 관찰한 보고들^{3, 12, 13)}이 많았다. 이 보고들은 짧은 시간의 관찰에서 얻은 자료들이므로 만성신부전에서의 결과로 해석하는데 어려움이 있었으며, 관찰한 대상도 주로 혈장 ANP 농도 혹은 심방내 ANP 농도 변동에 국한되어 있다^{12, 14, 15)}. 만성신부전 실험동물의 연구에서 혈장 ANP 농도의 변동이 시기에 따라 차이가 있다. 주로 4주일 이내의 단기적 관찰¹⁴⁾에서는 증가하였고 장기간의 관찰¹⁶⁾에서는 변동이 없다고 보고하였다. 그러므로 단순히 혈장 ANP 농도 측정만으로 신장기능 저하에 대한 ANP의 조절 기능을 파악하는데 제한점이 있는 것으로 생각된다.

최근에 ANP가 심장외에도 체액과 전해질 조절의 중추인 시상하부를 포함한 뇌에서 신호전달물질로 작용하여 생체의 항상성을 유지하는 역할을 담당하는 것으로 알려졌다¹³⁾. 그리고 ANP의 최종 표적장기 중의 하나인 신장에서도 ANP가 심장과는 별도로 합성 분비된다고 보고되었다¹⁷⁾. 현재 만성신부전의 초기에 증가한 후 시간이 진행되면서 뚜렷한 변동을 보이지 않는 혈장 ANP 농도와 함께 심장외의 다른 장기에서의 ANP 합성과 그 기능적 조절 작용에 대한 연구가 진행 중에 있다. 따라서 체액과 전해질 조절에 관여하는 중요 장기에서의 ANP 조절 기능을 관찰하는 것이 ANP의 기능을 파악하는데 더 큰 의미가 있을 것이라고 생각된다.

이 실험은 동물에서 실험적으로 만성신부전을 유도한 다음 비교적 장시간의 관찰을 통해 신장 실질의 감소에 따른 신장기능 저하에 대해 신장기능을 향상시키는 보상적 조절을 한다고 알려진 ANP 기능을 알아보기 위해 혈장 ANP 농도 측정과 함께 심방 및 심실 그리고 시상하부와 신장에서의 ANP mRNA의 변동을 측정하여 종합적으로 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 만성신부전 쥐 유도

실험은 체중 280-350g의 Sprague-Dawley종 수컷 쥐를 대상으로 sham 수술 쥐와 만성신부전(이하 CRF라 함) 쥐로 나누었다. Sham 쥐는 ether 마취하에 등쪽 접근법으로 피부를 절개한 후 신결찰 및 신결제술을 제외하고는 동일한 수술적 조작을 한 후 피부를 재봉합하였다. CRF 쥐는 Gretz 등¹¹⁾의 방법에 따라 2단계에 걸쳐 유도하였는데, 먼저 ether로 마취한 다음 등쪽에서 최초 옆 좌측 1cm 및 늑골 최하단에서 1cm 되는 부위에서 시작하여 길이방향으로 1.5-2cm 피부를 절개하여 좌측 신장을 노출시킨 후 신장의 윗쪽과 아랫쪽 1/3씩을 실로 결찰하는 일차수술을 시행하였다. 일차수술 1주일 후에 상기한 방법과 마찬가지로 우측 신장을 노출시켜 우측 신동맥, 신정맥 및 요관을 결찰하고 신결제술을 시행하여 결국 전체 신장 중 5/6를 제거하는 이차수술을 하였다.

실험동물은 각 군마다 5마리씩 사용하였고, 기온 23±2°C에서 주야 각각 12시간씩 조절되는 사육실에서 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다. Sham 쥐는 최종수술 후 8주에 결과를 관찰하였고, CRF 쥐는 만성신부전의 경과에 따른 ANP의 변동을 관찰하기 위해 CRF 8주 쥐와 12주 쥐로 나누어 결과를 관찰하였다.

2. 혈액 채취 및 조직 적출

최종 실험 일에 ether 마취하에서 복부를 절개하여 복부 대동맥을 통해 혈액을 채취하였다. ANP mRNA의 변동을 파악하고자 좌측 신장을 적출하였으며 흉골정중절개로 흉곽을 개방한 후 심장을 적출하였다. 심장은 우심방과 좌심실을 분리하였다. 실험동물의 머리를 자른 후 뇌를 적출하여 시상하부를 분리 채취하였다. 각 조직을 적출한 후 즉시 -70°C에서 냉동

보관하였다.

3. 혈청 요소 질소 측정

Sham 쥐, CRF 8주 및 12주 쥐에서 각각 신기능을 파악하고자 혈청 요소 질소(urea nitrogen) 농도를 Diagnostic Kit(Cat. No. 535-B, Sigma, USA)를 이용하여 spectrophotometer(DU650, Beckman, USA)로 정량하였다.

4. 혈장 ANP 농도 측정

혈장 ANP 농도 측정을 위해 채혈된 혈액 2mL을 혈액보존액(EDTA, 1mg/mL; phenylmethyl sulphonyl fluoride, 10mM; aprotinin, 500 KIU/mL; soybean trypsin inhibitor, 50 BAEE U/mL)과 섞은 즉시 4°C에서 원심분리(1000×g, 5분)하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장 1mL을 Sep Pak C18 cartridge(Waters Associates, USA)를 통과시킨 다음, 60% acetonitrile과 0.1% trifluoroacetic acid로 유효 단백질 성분을 추출하여 농축 건조한 후 -20°C에 보관하였다가 방사면역법(radioimmunoassay)을 이용한 ANP Kit(RPA 512, Amersham Life Science, UK)로 정량하였다.

5. 조직의 ANP mRNA 발현 측정

적출한 각 조직에 2mL의 RNAzolTM B(TEL-TEST Inc., USA)를 넣고 Polytron(PT1200, Kinematica AG, Switzerland)으로 조직을 균질화 시킨 후 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 diethylpyrocarbonate를 처리한 증류수에 녹여 UV spectrophotometer(DU650, Beckman, USA)로 260nM 파장에서 RNA 농도를 측정하고, -20°C에 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 20pM의 ANP(sense : 5'-ATGGATCTCCAGAAGGTGCT-3'; antisense : 5'-CTGCCATCGTGGATTGTTCTG-3')와 GAPDH(sense : 5'-CTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'; antisense : 5'-ACAACCTGGCCTCAGTGTA-3')의 두 종류를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응은 합

성된 cDNA 1.3 μL에 10×buffer II, MgCl₂, 10mM dNTPs(dCTP의 1/2 volume은 [³²P]-dCTP로 대체), primer, 5U/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°C에서 5분간 열처리한 후 95°C에서 1분간 denaturation시켰고, ANP는 55°C에서 1분간 그리고 GAPDH는 56°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하여 ANP는 30회 그리고 GAPDH는 26회 시행한 후 72°C에서 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 측정하였다. ANP mRNA 발현의 값은 각각의 GAPDH mRNA 발현에 대한 비로 나타냈으며, CRF 쥐의 각 장기별 ANP mRNA 발현을 해당하는 sham 쥐의 발현에 대한 상대적인 값으로 표시하였다.

6. 통계학적 자료 처리

측정한 각각의 자료는 평균과 표준오차로 표시하였으며, sham 쥐와 CRF 쥐의 결과에 대한 비교는 Student's t-test를 통해 유의성을 검정하였고, 통계학적 유의성은 p값이 0.05 미만으로 정하였다. 혈청 요소 질소 및 혈장 ANP에 대한 각 조직의 ANP mRNA/GAPDH mRNA 비의 상관관계에 대한 분석은 linear regression analysis 방법으로 하였다.

결 과

Sham 쥐와 CRF 쥐의 혈청 요소 질소 농도 및 체 중 증가율의 변동은 Fig. 1과 같으며, 신장기능 저하시ک 증가하는 혈청 요소 질소의 농도는 sham 쥐의 27.3±3.08mg/dL에 비해 CRF 쥐에서 유의하게 증가($p < 0.01$)하였으며, CRF 8주 쥐(61.3±10.51mg/dL)에 비해 CRF 12주 쥐의 값(66.0±10.61mg/dL)이 더 증가하는 경향으로 보아, 부분 신절제술로 만성신부전이 잘 확립된 것으로 보인다. 처음 수술 후와 최종 실험 일에 측정한 체중 증가의 변동은 유의한 차이는 없었지만, CRF 쥐가 sham 쥐에 비해 적게 증가하였다.

Fig. 1. Serum urea nitrogen(upper panel) and percent increase of body weight(lower panel) in sham and chronic renal failure(CRF) rats. Data are collected at 8 weeks in sham and CRF 8 wk rats and at 12 weeks in CRF 12 wk rat after surgical operation, respectively. Data are mean and standard error of five rats in each group. ** $p<0.01$ vs. sham rat.

Fig. 2. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide(ANP) in sham and chronic renal failure(CRF) rats.

혈장 ANP 농도는 sham 쥐의 $69.4 \pm 10.30 \text{ pg/mL}$ 에 비해 CRF 8주 및 12주 쥐에서 각각 172.8 ± 62.55 및 $103.8 \pm 31.51 \text{ pg/mL}$ 로 증가하였지만 유의성은 없었다. 혈장 ANP 농도는 신부전이 만성으로 진행되면서 계

Fig. 3. ANP mRNA expression from right atrium in sham and chronic renal failure(CRF) rats.
(A) Each of two representative autoradiograms from three 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 CRF rats were further divided by those of the sham rat.

속 증가되어 유지되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2). 각 조직에서의 ANP mRNA의 발현정도를 GAPDH mRNA의 발현정도에 비교하여 나타낸 결과는 Fig. 3에서 6과 같으며, 각 조직마다 ANP의 상대적인 발현 양상은 상이하였다. 우심방에서 ANP mRNA의 발현은 CRF 쥐에서 sham 쥐에 비해 평균적으로 약간 증가하는 경향이 있었지만 양군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3). 좌심실에서는 우심방과는 다르게 ANP mRNA 발현의 정도가 CRF 8주 쥐에서 sham 쥐에 비해 1.2 ± 0.05 배의 유의한 증가($p<0.05$)를 보였고, CRF 12주 쥐에서도 개체간의 편차가 있었지만 1.9 ± 0.45 배 증가하였으며 CRF 8주 쥐와 12주 쥐 사이에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 4). 시상하부에서는 sham 쥐에 비해 CRF 쥐에서 ANP mRNA의 발현이 유의하게 감소($p<0.05$) 하였고, CRF 12주 쥐에서는 sham 쥐에 대해 0.5 ± 0.13 배로 감소하여 CRF 8주 쥐의 0.8 ± 0.05 배 감소에 비해 더 유의한 발현의 저하($p<0.05$)가 있었다(Fig. 5). 신장에서 ANP mRNA 발현은 유의한

Fig. 4. ANP mRNA expression from left ventricle in sham and chronic renal failure(CRF) rats.
(A) Each of two representative autoradiograms from three groups.
(B) The relative expression levels of ANP mRNA are mean and standard error of five rats in each group. * $p<0.05$ vs. sham rat.

차이는 아니었지만, sham 쥐에 비해 CRF 8주 쥐는 1.5 ± 0.24 배, 그리고 CRF 12주 쥐는 1.6 ± 0.43 배로 평균적으로 크게 증가하는 경향이었다(Fig. 6).

Sham 쥐와 CRF 쥐에서 신장기능 저하에 따른 각 조직에서의 ANP 합성 변동을 통한 ANP의 조절 기능을 파악하기 위해 시행한 혈청 요소 질소와 각 조직의 ANP mRNA 발현 사이의 상관관계에서 혈청 요소 질소 농도에 대해 좌심실($p<0.001$)과 신장($p<0.01$)에서 유의한 직선 정비례 관계가 있었으며, 시상하부($p<0.05$)에서는 유의한 직선 반비례 관계를 나타내었다 (Fig. 7). 그리고 혈장 ANP 농도에 대한 각 조직의 ANP mRNA 발현과의 연관성 조사에서 우심방($p<0.01$)과 신장($p<0.01$)에서 유의한 직선 정비례 관계를 관찰하였다(Fig. 8).

Fig. 5. ANP mRNA expression from hypothalamus in sham and chronic renal failure(CRF) rats.
(A) Each of two representative autoradiograms from three groups.
(B) The relative expression levels of ANP mRNA are mean and standard error of five rats in each group. * $p<0.05$ vs. sham rat; # $p<0.05$ vs. CRF 8 wk rat.

Fig. 6. ANP mRNA expression from kidney in sham and chronic renal failure(CRF) rats.
(A) Each of two representative autoradiograms from three groups.
(B) The relative expression levels of ANP mRNA are mean and standard error of five rats in each group.

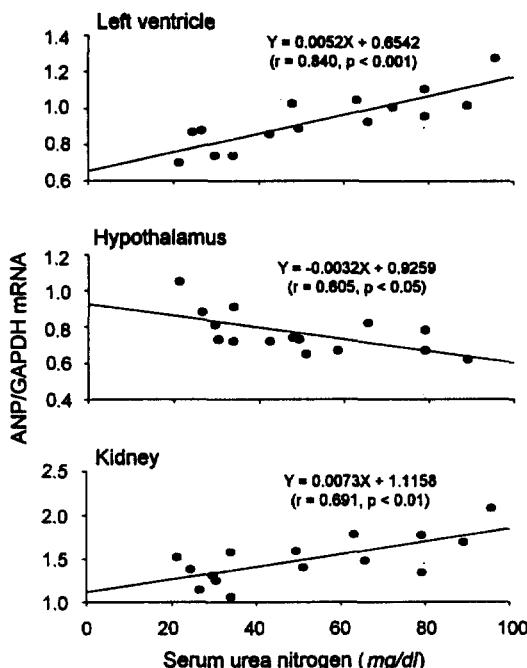


Fig. 7. Correlations of serum urea nitrogen levels with ANP/GAPDH mRNA expression ratios from left ventricle, hypothalamus and kidney in sham and chronic renal failure rats.

고찰

심방이뇨호르몬(ANP)은 처음에 우심방의 심근세포에서 분비된다는 것이 알려진 이후로⁸⁾, 사람이나 실험동물에서 세포외액량 증가¹⁸⁾, 고염분 섭취⁵⁾, 울혈성 심부전과 본태성 고혈압¹⁹⁾ 그리고 만성신부전¹⁵⁾ 등에서 혈중 농도가 증가함이 보고되고 있다. ANP는 신장에서 신혈류량 증가, 사구체 여과율 증가, 신세뇨관의 나트륨 재흡수의 감소 그리고 renin 생성세포에 직접 작용하여 renin 분비를 감소시키며, angiotensin II 생성 및 aldosterone 생합성을 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

이 실험에서는 5/6 부분 신절제술을 시행한 후 8주 및 12주를 경과하면서 혈장 요소 질소 농도가 2배 이상 증가하였는데, 이 결과로 신기능이 서서히 감소되어 12주에는 만성신부전이 확립되었음을 알 수 있었다.

혈장 ANP 농도의 변동을 관찰한 결과, CRF 8주

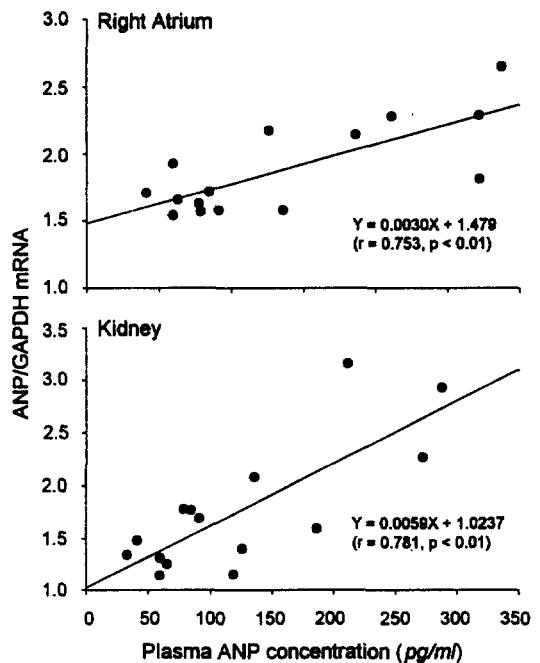


Fig. 8. Correlations of plasma ANP concentrations with ANP/GAPDH mRNA expression ratios from right atrium and kidney in sham and chronic renal failure rats.

쥐에서 sham 쥐에 비해 유의하지 않은 정도의 평균적인 증가를 나타낸 후 CRF 12주 쥐에서는 오히려 8주 쥐에 비해 낮은 농도를 나타내었다.

실험적으로 5/6 부분 신절제술의 동물실험 모형을 만든 다음, 혈중 ANP 농도 변동을 관찰한 기존의 보고에서 만성신부전 모형을 만든 후 3일째 측정한 혈장 ANP 농도는 변화가 없다²¹⁾고 하였지만, 이 결과는 시간적으로 만성신부전이 확립되었다고는 볼 수 없는 초기의 소견이라 생각된다. 비교적 장시간을 관찰한 연구 결과 중에서 신절제술 후 4주 이내의 혈장 ANP 측정에서는 그 농도가 증가하였다^{3, 14, 15)}. 그러나 이 실험과 동일한 실험동물 모형에서 관찰한 결과들 중에 14주 동안 혈장 ANP 농도에서 변화가 없었으며¹⁶⁾, 혈장 ANP 농도가 수술 후 8주에 대조치 보다는 증가하였지만 4주에 비해서는 오히려 감소한 결과도 있다²²⁾. 그리고 일측 신절제 모형(unilateral nephrectomy model)을 이용한 실험에서 4주에는 혈장 ANP가 증가하였지만, 60일 후에는 오히려 감소하여 대조치와 차이가 없었던 보고도 있다²³⁾. 그러므로 만

성신부전의 초기에는 신장실질 크기의 감소에 대한 보상작용과 신장을 통한 배설 기능의 저하에 의한 체액량 증가로 인해 ANP 분비의 증가¹⁵⁾, 신장에서의 ANP 대사의 저하²⁴⁾와 ANP 제거 수용체의 down regulation³⁾으로 혈장 ANP 농도가 증가되지만, 만성 신부전이 계속 진행되면서 더 이상의 혈장 ANP 농도의 증가는 일어나지 않는 것으로 보인다. 하지만 신장에서의 배설을 통해 체내 나트륨 균형을 유지하기 위해서 순환중인 혈액의 ANP보다는 신장에서 합성된 ANP가 국소적으로 신장의 나트륨 배설을 조절하는데 더 중요한 역할을 한다는 보고^{25, 26)}와 만성신부전 모형의 쥐에서 5주 이후부터는 수분과 전해질 균형을 유지하기 위해 혈장 ANP 농도 증가를 통해서 조절하는 기전과는 다른 별도의 조절 인자가 작용할 것이라는 보고²³⁾로 보아 단순히 혈장 농도의 변동만으로 ANP의 조절 작용을 전부 해석하는 것은 한계가 있을 것이라 생각된다.

ANP는 심방에 국한된 호르몬이 아니며 심방이외의 조직에서도 합성 분비되는 것으로 보고가 되고 있는데¹¹⁾, 심장비후와 장기간의 고혈압에서는 심실에서도 ANP 합성이 증가된다²⁷⁾. 시상하부에서 ANP 농도를 최초로 측정²⁸⁾한 이후, 시상하부에서 ANP가 신경 전달물질 혹은 신경매개물질로 작용하여 신경 활동성을 억제시키며, renin-angiotensin-aldosterone계 및 항이뇨호르몬계의 조절에 영향을 주어 체액량과 혈압의 조절에 관여하는 ANP의 중추적 기능²⁹⁾에 많은 관심이 모이고 있다. 그리고 ANP의 최종 표적장기 중의 하나인 신장에서도 혈액 중의 나트륨 농도나 체액량의 증가를 감지하고 자체적으로 ANP의 합성과 분비를 조절하여, 신장에서의 합성과 구별되는 독자적인 신장내의 역할도 있다¹⁷⁾.

만성신부전의 경과에 따른 우심방, 좌심실, 시상하부 및 신장에서 ANP 합성의 변동을 ANP mRNA 발현을 통해 살펴본 결과, 각 장기마다 다른 양상을 보였는데 좌심실에서는 ANP mRNA 발현이 유의하게 증가하였고 우심방과 신장에서는 유의하지는 않았으나 증가하는 경향을 보였지만, 시상하부에서는 오히려 유의하게 감소하였다. 이 실험과 같은 5/6 부분 신절제술을 시행한 후 비교적 초기라 할 수 있는 12일째 관찰한 Geiger 등¹³⁾은 혈장 ANP 농도의 증가 및 뇌의 ANP 농도의 증가를 보고한 바 있으나, 이번 실험과 같이 CRF 쥐에서 8주 및 12주에 걸쳐 장시간

관찰하면서 ANP의 중요 조절장기에서 합성 단계 변동을 관찰한 보고는 없었다.

심장의 ANP 합성 및 분비의 가장 잘 알려진 자극은 우심방의 신전으로 알려져 있으며¹¹⁾, 이번 실험과 같은 만성신부전 모형에서는 나트륨과 수분의 축적으로 혈액량과 혈압이 증가된다^{15, 16)}. 지금까지 부분 신절제술에 의한 만성신부전 모형에서 수일에서 수주 후에 우심방의 ANP 농도가 증가하는 경향이 있다는 보고들^{30, 31)}이나 우심방 ANP 합성이 증가할 것이라 추정한 보고²⁾가 있을 정도이다. 좌심실의 경우에서도 만성신부전 모형 보다는 올혈성 심부전³²⁾, 신성고혈압²⁷⁾ 및 고염분 섭취¹⁷⁾ 등의 조건에서 ANP 합성이 증가한다는 보고들뿐이었다.

만성신부전에서 우심방 ANP mRNA 발현의 증가를 발표한 상기 보고들의 대체적인 해석은 수분과 나트륨 축적에 의한 혈액량 증가로 인해 심방 특히 우심방의 신전을 초래하여 나타난 결과로 생각된다²⁾. 하지만 실험적으로 two-kidney one-clip으로 신성고혈압을 유도한 쥐에서 10주에 우심방의 ANP 합성은 변화가 없었으며³³⁾, 이 결과는 전신적 혈압의 증가와 우심방 ANP 합성 사이에는 연관성이 적다는 것을 시사한다. 반면에 혈액량 증가로 심장비후와 고혈압을 유도한 결과, 심방에는 변동이 없었지만 좌심실의 ANP mRNA는 증가하는 양상을 보여 심장의 심방과 심실의 ANP 발현 조절계가 다른 것으로 보인다. 따라서 이 실험의 좌심실의 ANP mRNA 발현 증가의 결과는 혈액량의 증가 혹은 혈압(심장 후부하)의 증가에 의해 심장 즉 좌심실의 ANP 합성이 증가되는 것으로 생각된다³³⁾. 하지만 심부전의 실험에서 초기에는 심실의 ANP 농도가 증가한 반면 점차 질병이 진행되어 심부전이 심한 상태가 되면 심실의 ANP 농도가 감소한다는 보고³⁴⁾가 있다. 이처럼 만성적으로 너무 심한 심부전 혹은 심장비후가 있는 경우에는 심실의 ANP 합성 기전에 변동이 초래될 수 있음을 시사하였다¹¹⁾. 이번 실험에서 좌심실의 발현 증가의 정도가 CRF 쥐 8주에는 sham 쥐에 비해 유의한 증가를 나타냈지만, CRF 12주에서 평균치는 크게 증가한 반면에 개체별로 큰 차이를 보여 sham 쥐에 비해 유의한 차이를 나타내지 못한 것은 상기한 Ruskoaho¹¹⁾의 견해와 같이 만성신부전이 진행되면서 장기적인 혈액량의 증가에 의해 심실의 ANP 합성 기전의 변동이 생긴 결과로 생각된다.

체액량과 삼투질 농도의 조절 중추인 시상하부에서도 ANP가 합성되고²⁸⁾, 시상하부에서 면역반응성 ANP가 발견되었다³⁵⁾. 시상하부 ANP의 작용은 혈액량과 삼투질 농도 조절에 관여하는 시상하부 신경의 활동성을 억제시키며 심혈관계의 중추적 조절 기전에 관여한다²⁹⁾. 시상하부의 ANP는 안정상태에서 항이뇨호르몬의 기초적 분비를 감소시키고 출혈 혹은 탈수 상태에서 분비되는 항이뇨호르몬의 양도 감소시키는 작용이 있으며³⁶⁾, 3일간의 탈수 후에 쥐의 시상하부 ANP 농도가 증가된다는 보고²⁹⁾도 있다. 그리고 중추 신경계의 ANP는 신장의 전해질 배설에는 직접적인 연관은 없지만³⁷⁾, 중추성 angiotensin II와 기능적인 길항적 조절작용을 통하여³⁸⁾ 체액조절에 관여할 가능성이 시사되며, 실제로 외측 뇌실에 angiotensin을 투여하면 ANP를 투여할 때와 반대의 반응이 생긴다⁹⁾. 뇌의 angiotensin이 미량(femtomolar 수준)으로 존재하여 그 농도를 측정하는 것은 어렵지만, 실험적으로 angiotensin II 전환효소(ACE) 억제 약물을 만성신부전 쥐의 뇌에 투여하면 뇌의 ANP 합성이 증가된다는 것을 증명하였다¹³⁾. 이처럼 시상하부의 ANP 역할이 angiotensin과 같은 ANP의 길항작용 호르몬에 의해 조절되므로, 이번 실험에서 신부전이 만성으로 진행됨에 따라 시상하부의 ANP 합성이 감소된 것은 위 사실에서와 같이 체액 및 전해질 균형을 유지하는 ANP의 중추적 역할이 상대적으로 약해진다는 것을 간접적으로 시사한다고 생각된다.

신장도 역시 심방이외의 ANP 합성 장소이며³⁹⁾, 신장에서 합성된 ANP가 국소적으로 신장의 나트륨 배설을 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 신장의 ANP mRNA를 관찰한 보고들 중에는 고염분 섭취 쥐¹⁷⁾, 당뇨 쥐⁴⁰⁾ 그리고 실험 쥐에게 수분 섭취를 제한하여 탈수를 유발시킨 경우⁴¹⁾에 ANP mRNA가 증가하였다고 보고하였다. 이들 실험의 조건은 체내 혈액량을 증가시키거나 혹은 체내 전해질 농도의 증가가 발생되어 심장에서 합성이 증가된 ANP가 혈액으로 분비되어 여러 조직에서 작용을 나타내어 체액 조절에 관여할 수 있는 조건들이다. 비록 신장에서 합성된 ANP가 혈장으로 유입되어 혈액 중의 ANP 농도에 영향을 주지는 않겠지만, 신장에서 합성된 ANP는 paracrine 혹은 autocrine 기능으로 신장을 통해 전해질 균형 특히 나트륨 배설에 국소적으로 관여하는 것으로 생각된다⁹⁾. 즉 신장에서 전해질 불균형을 감지하-

여 ANP를 합성 분비하여 국소적으로 나트륨과 수분의 항상성을 조절하며, 혈관수축물질에 대해 반대 작용인 혈관확장을 통해 신혈류량을 유지하는 신장의 자동조절에 관여한다고 하였다⁴¹⁾. 따라서 이번 실험에서 sham 쥐에 비해 CRF 쥐의 신장 ANP 합성이 점진적으로 증가하는 양상을 보인 것은 만성신부전에 의해 발생되는 전해질의 불균형에 대해 신장에서 국소적으로 ANP 합성을 증가시켜 나트륨 배설을 증가시키는 조절 반응의 가능성을 시사해 주고 있다.

신장기능 저하에 따른 체액 및 전해질 불균형에 대해 각 조직에서의 ANP 조절 반응을 파악하기 위해 시행한 혈청 요소 질소 농도와 ANP mRNA 발현 정도의 상관관계에서 좌심실과 신장에서는 유의한 직선 정비례관계를 나타내고 시상하부에서는 유의한 직선 반비례관계를 나타내었다. 혈청 요소 질소의 증가는 신기능이 저하되는 것을 의미하며, 이런 상황에서는 CRF 쥐에 체액량 혹은 혈압의 증가가 초래될 가능성이 있다. 따라서 신장기능의 저하가 초래됨으로 인해 정상 상태에 ANP 합성이 거의 없었던 좌심실과 신장에서 보상적 조절반응으로 ANP 합성이 증가된 것으로 생각된다^{17, 41)}. 하지만 신장기능 저하에 대해 시상하부에서 ANP 합성은 감소하였다. 부분 신질제술로 만든 CRF모형 쥐에서 혈장 angiotensin II 및 aldosterone 농도가 증가하였다는 보고¹⁶⁾와 시상하부에서 angiotensin II가 ANP에 대해 길항작용을 한다는 보고¹³⁾가 있다. 그러므로 이번 실험에서 시상하부의 ANP의 감소와 angiotensin계 항진의 관련 가능성에 대해서는 연구되어져야 할 과제라 생각된다.

이 실험에서 혈장 ANP 농도에 대한 각 조직의 ANP mRNA 발현의 상관관계를 관찰한 결과 우심방과 신장에서 유의한 직선 정비례관계를 나타내었다. 정상 혹은 안정 상태에서는 우심방이 ANP의 합성 분비의 주된 장소이다¹¹⁾. 하지만 신기능의 저하가 진행되어 전신적인 체액량이 증가되고 전해질의 불균형이 초래되어 혈장 ANP 농도가 증가될 수 있는 경우에는, 신장에서 합성된 ANP가 직접적으로 혈장 ANP 농도에 영향을 미치지 않겠지만 혈장 ANP 농도 증가에 비례적인 방향으로 신장에서도 ANP mRNA 발현이 증가하여 국소적으로 ANP의 기능이 향상된다는 것을 보여준다.

따라서 실험적으로 유도된 만성신부전 환쥐의 신장 기능 저하와 체액량 증가에 대해 우심방, 좌심실, 신

장 및 시상하부의 ANP mRNA 발현이 다르게 나타났다. 체액과 전해질 조절의 중추가 있는 시상하부에서는 ANP의 합성이 억제되었지만, 정상 상태에서 발현의 정도가 낮은 좌심실과 신장에서는 ANP mRNA 발현의 증가를 통해 각각 전신적 그리고 국소적으로 ANP의 보상적 기능 항진이 초래되는 것으로 생각된다.

= Abstract =

Expression of Atrial and Extra-atrial ANP mRNA in Rats with Chronic Renal Failure

Won Kee Lee, M.D., Won Kyun Park, M.D.
Young Su Hong, M.S., Dae Kyu Song, M.D.
and Jae Hoon Bae, M.D.

Department of Physiology & Kidney Institute,
Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea

Chronic renal failure(CRF) may lead to fluid retention and electrolyte imbalance, and consequently increases the extracellular volume and blood pressure. These changes can trigger secretion and synthesis of atrial natriuretic peptide(ANP) as a compensatory regulator for increases in the glomerular filtration rate and excretion of water and sodium due to the reduced number of functional nephrons. ANP may exert important regulatory role on body fluid balance and blood pressure in CRF. We assessed changes in gene expression of atrial and extra-atrial ANP associated with progression of renal failure in subtotal nephrectomized rats.

Adult male Sprague-Dawley rats were divided into sham and CRF rats. CRF rats were induced by 5/6 subtotal nephrectomy. We determined the plasma ANP level using by radioimmunoassay and the ANP mRNA from the right atrium, left ventricle, hypothalamus and kidney were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction with ^{32}P -dCTP at 8 wk in sham, and at 8 and 12 wk in CRF rats. Serum urea nitrogen(SUN) was also checked as an indicator of impaired renal function.

SUN was significantly increased in CRF rats and the level was higher at CRF 12 wk rat than CRF 8 wk rat. Plasma concentration of ANP also increased in CRF rats compared with sham rat, but was not statistically significant. Altered patterns of ANP mRNA expression were different in each tissue. Right atrial and renal ANP mRNA expressions were

slightly increased in CRF rats. Left ventricular ANP mRNA was significantly increased in CRF 8 wk rat compared with sham rat and maintained high at CRF 12 wk rat. However hypothalamic ANP mRNA expressions at CRF rats were decreased and the expression in CRF 12 wk was significantly lower than that at CRF 8 wk. SUN showed positive correlations with expression in left ventricular and renal ANP mRNA, but had a significant negative relationship with hypothalamic ANP mRNA. Plasma ANP concentration was positively correlated with the ANP mRNA expressions in both right atrium and kidney.

The present study demonstrated that ANP mRNA in the right atrium, left ventricle, kidney and hypothalamus were differentially expressed upon CRF. This suggests that roles of the local ANP in these tissues are regulated by different mechanisms to compensate the fluid and electrolyte imbalance in rats with experimental chronic renal failure.

Key Words : Chronic renal failure, Atrial and extra-atrial ANP mRNA

참 고 문 헌

- 1) Gretz N, Waldherr R, Strauch M : The remnant kidney model, in Experimental and Genetic Rat Models of Chronic Renal Failure, edited by Gretz N, Strauch M, Basel, Karger, 1993; p1-28
- 2) Wong NL, Wong EF : Effect of dietary sodium on atrial natriuretic factor released in rats with chronic renal failure. *Nephron* 61:464-469, 1992
- 3) Luk JK, Wong EF, Wong NL : Downregulation of atrial natriuretic factor clearance receptors in experimental chronic renal failure rats. *Am J Physiol* 269:H902-H908, 1995
- 4) Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM : Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 76:612-619, 1985
- 5) Zhang P, Mackenzie HS, Troy JL, Brenner BM : Effects of natriuretic peptide receptor inhibition on remnant kidney function in rats. *Kidney Int* 46:414-420, 1994
- 6) Smith S, Anderson S, Ballermann BJ, Brenner BM : Role of atrial natriuretic peptide in adaptation of sodium excretion with reduced renal mass. *J Clin Invest* 77:1395-1398, 1986
- 7) Shermin D, Dworkin LD : Sodium balance in renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:128-132, 1997
- 8) De Bold AJ : Heart atrial granularity effects of

- changes in water electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med* 161:508-511, 1979
- 9) Goetz KL: Physiology and pathophysiology of atrial peptides. *Am J Physiol* 254:E1-E15, 1988
- 10) Ballermann BJ, Zeidel ML, Gunning ME, Brenner BM: Vasoactive peptides and kidney, in The Kidney, 4th ed, edited by Brenner BM, Rector FC Jr, Philadelphia, WB Saunders, 1991;p510-583
- 11) Ruskoaho H: Atrial natriuretic peptide: Synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44:479-602, 1992
- 12) Petersen JS, Bech OM, Steiness E, Kirstein D, Korsgaard N, Baandrup U, Christensen S: Atrial content and plasma levels of atrial natriuretic peptides in rats with chronic renal failure. *Scand J Clin Lab Invest* 48:431-449, 1988
- 13) 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* 44:24-29, 1993
- 14) Nitta K, Naruse M, Sanaka T, Tsuchiya K, Sugino N: Role of atrial natriuretic peptide on sodium homeostasis in experimental renal failure. *Jpn J Exp Med* 59:181-188, 1989
- 15) Wong NL, Luk JK, Wong EF: In vitro hormone-stimulated atrial natriuretic factor release is increased in experimental renal failure. *Nephron* 69:59-64, 1995
- 16) Jin H, Yuan ZY, Du XH, Su G, Zhang L, Wang MX, Dong Y, Liu DX, Zou WZ, Wang SL: Relation between plasma atrial natriuretic peptide(ANP) and glomerular ANP receptors in 5/6 nephrectomized rats. *Chin Med J* 103:794-799, 1990
- 17) Lee YS, Shin SJ, Tan MS, Hsieh TJ, Tsai JH: Increased renal atrial natriuretic peptide synthesis in rats with deoxycorticosterone acetate-salt treatment. *Am J Physiol* 271:F779-F789, 1996
- 18) Anderson JV, Christofides ND, Blood SR: Plasma release of atrial natriuretic peptide in response to blood volume loading. *J Endocrinol* 109:9-13, 1986
- 19) Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS: Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in human. *Science* 231:1145-1147, 1986
- 20) Martinez-Maldonado M, Benabe JE, Cordova HR: Chronic clinical intrinsic renal failure, in The Kidney; Physiology and Pathology, 2nd ed, edited by Seldin DW, Geibisch G, New York, Raven Press, 1992;p3227-3282
- 21) Luft FC, Sterzel RB, Lang RE, Trabold EM, Veelken R, Ruskoaho H, Gao Y, Ganter D, Unger T: Atrial natriuretic factor determinations and chronic sodium homeostasis. *Kidney Int* 29:1004-1010, 1986
- 22) 신영호, 배재훈, 강문규, 송대규, 김현철, 박원균: 실 험적 만성신부전 환자에서 심방이뇨호르몬의 변동. *대한신장학회지* 17:16-24, 1998
- 23) Averbukh Z, Berman S, Weissgarten J, Cohn M, Golik A, Cohen N, Shaked U, Modai D: Relationship between renal mass and atrial natriuretic peptide release. I. Paradoxical effect of unilateral nephrectomy on serum atrial natriuretic peptide in rats. *Renal Physiol Biochem* 17:101-107, 1994
- 24) Berg JA, Hayashi M, Fujii Y, Katz AI: Renal metabolism of atrial natriuretic peptide in the rat. *Am J Physiol* 255:F466-F473, 1988
- 25) Goetz KL, Drummer C, Zhu JL, Leadley RJ, Fiedler F, Gerzer R: Evidence that urodilatin, rather than ANP, regulates renal sodium excretion. *J Am Soc Nephrol* 1:867-874, 1990
- 26) Greenwald JE, Needleman P, Wikins M, Schreiner GF: Renal synthesis of atriopeptin-like protein in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol* 260:F602-F607, 1991
- 27) 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
- 28) Tanaka I, Misono KS, Inagami T: Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: Determination by specific radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 124:663-668, 1984
- 29) Haskins JT, Zingaro GJ, Lappe RW: Rat atriopeptin III alters hypothalamic neuronal activity. *Neurosci Lett* 67:279-284, 1986
- 30) Latton AL, Michel JB, Arnauld E, Corvol P, Soubrier F: Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am J Physiol* 251:H890-H896, 1986
- 31) Garcia R, Cantin M, Gutkowska J, Thibault G: Atrial natriuretic factor during development and reversal of one-kidney, one clip hypertension. *Hypertension* 9:144-149, 1987
- 32) Ding J, Thibault G, Gutkowska J, Garcia R, Karabatos T, Jasmin G, Genest J, Cantin M: Cardiac and plasma atrial natriuretic factor in experimental congestive heart failure. *Endocrinology*

- 121:248-257, 1987
- 33) Matsubara H, Yamamoto J, Hirata Y, Mori Y, Oikawa S, Inada M : Changes of atrial natriuretic peptide and its messenger RNA with development and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Circ Res* 66:176-184, 1990
- 34) Moe GW, Grima EA, Angus C, Wong NL, Hu DC, Howard RJ, Armstrong PW : Response of atrial natriuretic factor to acute and chronic increases of atrial pressures in experimental heart failure in dogs. Role of changes in heart rate, atrial dimension, and cardiac tissue concentration. *Circulation* 83:1780-1787, 1991
- 35) Tanaka I, Inagami T : Release of immunoreactive atrial natriuretic factor from rat hypothalamus in vitro. *Eur J Pharmacol* 122:353-355, 1986
- 36) Samson WK : Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology* 40:227-229, 1985
- 37) 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(Suppl 6):S492-S496, 1986
- 38) Reid IA : Actions of angiotensin II on the brain : Mechanisms and physiological role. *Am J Physiol* 246:F533-F543, 1984
- 39) Ritter D, Needelman P, Greenwald JE : Synthesis and secretion of an atriopeptin-like protein in rat kidney cell culture. *J Clin Invest* 87:208-212, 1991
- 40) Shin SJ, Lee YJ, Tan MS, Hsieh TJ, Tsai JH : Increased atrial natriuretic peptide mRNA expression in the kidney of diabetic rats. *Kidney Int* 51:1100-1105, 1997
- 41) 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* 54:1617-1625, 1998