

## 신부분절제 흰쥐에서 고염분 섭취시 심방이뇨호르몬의 변동

계명대학교 의과대학 생리학교실, 신장연구소

강문규 · 박원균 · 홍영수 · 송대규 · 배재훈

### 〈요 약〉

흰쥐를 대상으로 5/6 신부분절제술로 만성신부전 모형을 유도한 다음 고염분을 섭취시켜 신장 기능 저하에 대한 나트륨 배설의 보상적 조절에 관여하는 심방이뇨호르몬(ANP)의 기능을 혈장 ANP 농도 및 각 장기에서의 ANP mRNA의 변동을 통해 파악하고자 하였다.

실험은 체중 300-370g의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대상으로 모의수술 쥐(sham 쥐)와 5/6 신부분절제 쥐(NPX 쥐)로 나누었다. Sham 쥐와 NPX 쥐는 최종 수술 후 6주부터 0.45% NaCl 용액을 2주일 동안 먹인 고염분 섭취(HS) 쥐와 전체 실험기간(8주)에 정상 염분 섭취 쥐로 각각 다시 나누었다. 수술 후 8주에 혈장 ANP 농도를 방사면역법으로 정량하였고 ANP 합성단계의 변동을  $^{32}P$  동위원소를 사용한 역전사-증합효소연쇄반응을 통해 ANP mRNA의 변동을 비교하였다.

최종 수술 8주 말에 관찰한 평균 동맥압과 심박수는 sham 쥐에 비해 NPX+HS 쥐에서 증가하였다. 체중은 sham 쥐에 비해 NPX 쥐들에서 체중의 증가가 작았지만, 1일 수분 섭취량은 NPX 쥐들에서 증가하였고 NPX+HS 쥐에서 더 유의한 증가를 보였다. 혈색소량, 적혈구 수 및 hematocrit은 NPX 쥐들에서 감소하였다. BUN 농도는 NPX 쥐들에서 sham 쥐보다 유의하게 증가되었다. 혈장 ANP 농도는 sham 쥐에 비해 sham+HS 쥐에서 유의한 증가를 보였으며, NPX 쥐들에서도 증가 경향이 있었지만 염분 섭취량에 따른 실험군 사이에 유의한 차이는 없었다. ANP 합성의 변동은 조직에 따라 차이가 있었다. 우심방에서 신절제 쥐들 및 고염분 섭취 쥐의 ANP mRNA가 sham 쥐에 비해 증가하는 양상이었다. 좌심실 ANP mRNA는 sham 쥐에 비해 sham+HS 쥐에서 증가하였으나, NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐에 비해 발현이 감소하였다. 시상하부에서는 섭취한 염분량과는 관계없이 NPX 쥐들에서 감소하는 경향이었고, 특히 NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐에 비해 유의하게 감소하였다. 신장에서는 sham+HS 쥐는 sham 쥐에 비해 ANP mRNA가 증가하였으며, NPX 쥐에서도 유의하지 않은 증가의 경향을 보였지만, NPX+HS 쥐에서는 다른 모든 조건의 실험군에 비해 오히려 유의하게 감소하였다.

이상의 결과로 신부분절제술로 유도된 만성신부전 흰쥐에서 고염분 섭취는 혈장과 심장 ANP에는 유의한 변동이 없이 신장에서 ANP 합성의 감소를 초래하여 체액 및 전해질 균형에 관여하는 신장 ANP 조절계의 역할을 저하시키는 요인으로 작용할 것이라 생각된다.

### 서 론

신부분절제술(subtotal nephrectomy)은 신장의 실

책임저자 : 배재훈 대구시 중구 동산동 194

계명대학교 의과대학 생리학교실

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

E-mail : jhbae@dsmc.or.kr

질 조직의 크기를 줄여 찬유하는 신원(nephron)에 작업량을 증가시켜 신손상을 초래시키고, 결국에는 만성 신부전을 유도하는 동물실험의 모형으로 소개되었으며<sup>1)</sup>, 그 방법 중에서 신장 전체의 5/6를 절제하는 모형이 만성신부전의 모형으로 많이 이용되고 있다<sup>2-5)</sup>.

나트륨이온은 세포외액의 중요한 용질로써 체내 전체 나트륨양과 세포외액량은 비례관계가 있다. 정상

상태에서는 나트륨 배설이 신장에 의해 정밀하게 조절되어 일일 염분양의 섭취가 다양해도 체내 전체 나트륨과 세포외액량은 일정하게 유지될 수 있다. 하지만 신장에 질병이 있는 경우에는 신장에서의 이런 나트륨 조절과 균형 유지에 변동이 초래될 수 있다<sup>6)</sup>. 특히 만성신부전 환자나 실험적으로 유도된 동물모형에서는 사구체여과율이 감소하고 기능적인 신원의 수적 감소로 나트륨 균형 조절에 변화가 초래되는데, 이에 대해 기능이 남아있는 신원에서 나트륨 배설이 증가되는 보상작용이 유도된다고 알려져 있다<sup>7, 8)</sup>. 이런 단위 신원의 나트륨 배설 증가에는 사구체여과율을 증가시키면서 원위세뇨관의 나트륨 재흡수를 억제하는 순환혈액중의 나트륨뇨 배설 인자가 관여할 것이라고 생각하였다<sup>6)</sup>. 그 중에서 심방의 혈액량 증가와 기계적 신전에 의해 심방에서 혈액으로 분비되는 심방이뇨호르몬(atrial natriuretic peptide, ANP)이 주로 신장의 보상작용에 관여하며, 그 역할에 대한 연구가 진행되고 있다<sup>2, 6)</sup>. ANP는 처음에 심방(atrium)의 심근세포에서 합성된다는 것이 발견되었으며<sup>9)</sup>, 심방의 기계적 신전이나 세포외액량의 증가에 의해 순환혈액으로 분비되어, 강력한 이뇨, 나트륨뇨 배설 및 혈압강하 효과가 있다고 보고되었다<sup>10, 11)</sup>.

현재까지 식이중의 염분량이 신장기능과 ANP에 어떤 영향을 주는지를 조사하기 위해 시행한 고염분 섭취 실험은 혈액이나 심방에서의 ANP 농도 측정에 국한된 것이 대부분이었다. 혈장 ANP 농도는 증가하거나<sup>2)</sup> 혹은 변화가 없다<sup>12)</sup>는 보고가 있으며, 심방의 ANP 농도에 대한 결과도 뚜렷한 변동이 없었다는 보고<sup>13, 14)</sup>가 많다. 하지만 ANP가 심방에서만 합성 분비되는 것이 아니고, 심장비후와 장기간의 고혈압에서는 심실에서도 ANP 합성이 증가된다는 것을 알게 되었으며<sup>15)</sup>, 체액과 전해질 조절의 중추인 시상하부를 포함한 뇌<sup>16)</sup>와 ANP의 최종 표적 장기중의 하나인 신장<sup>17)</sup>에서도 ANP가 합성 분비된다는 것이 알려진 후로, 심장외의 장소로 시상하부와 신장의 ANP 조절 기능에 대한 연구가 진행 중에 있다.

따라서 이 실험에서는 흰쥐를 대상으로 5/6 신부분절제술로 만성신부전 모형을 유도한 다음 평소 식이중의 염분 양보다 많은 양의 염분을 섭취시켜 만성신부전에서 고염분 섭취가 ANP에 미치는 영향을 관찰하며, 신장기능 저하에 대한 나트륨 배설의 보상적 조절에 관여하는 ANP의 기능적 역할의 변화를 혈장

ANP 농도 및 심방, 심실, 시상하부 그리고 신장에서의 ANP mRNA의 변동을 통해 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 신부분절제 쥐 유도

실험은 체중 300-370g의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대상으로 모의수술 쥐(sham 쥐)와 신부분절제 쥐(NPX 쥐)로 나누었다. NPX 쥐는 Gretz 등<sup>1)</sup>의 방법에 따라 유도하였는데, 먼저 마취한 다음 좌측 척추의 1cm 옆 선상에서 늑골 1cm 아래로부터 1-1.5cm 아래 방향으로 피부를 절개하여 좌측 신장을 노출시킨 후 신장의 2/3를 결찰하는 1차 수술을 시행하고, 1주일 후에 반대면 등쪽 접근법으로 우측신장의 신동맥, 신정맥 및 요관을 결찰하고 일측 신절제술을 시행하여 전체 신장의 5/6를 제거하는 신부분절제술을 시행하였다. Sham 쥐는 ether 마취하에 등쪽 접근법으로 피부를 절개한 후 NPX 쥐에서 시행한 신결찰 혹은 신절제술을 제외하고는 동일한 수술적 조작을 한 후 피부를 재봉합 하였다.

신부분절제 후 만성신부전으로 진행되는 과정에서 고염분 섭취에 따른 ANP의 조절 작용을 보기 위해 실험동물을 네가지 군으로 나누었다. 먼저 최종 수술 후 전체 8주 동안의 실험기간에 정상 사료와 물을 먹인 sham 쥐와 NPX 쥐로 나누었다. 고염분 섭취의 효과를 보기 위해 sham 쥐와 NPX 쥐들 중에 수술 후 6주 동안은 정상 염분을 섭취한 다음 7주째부터 물 대신에 0.45% NaCl 용액을 2주일 동안 먹었던 고염분 섭취 쥐인 sham+HS 쥐와 NPX+HS 쥐로 다시 나누었다. 실험동물들은 실온 23±2°C에서 주야 12시간씩 조절되는 방에서 사육하였다.

### 2. 동맥혈압 및 심박수 측정과 혈액 채취

동맥혈압 및 심박수의 측정은 최종 실험일인 수술 후 8주 말에 ether 마취하에 복부 대동맥에 카테터를 삽입하고 압력변환기에 연결하여 Cardiocap II(Datex-Engstrom Co., Finland)를 통해 기록하고, 미리 heparin을 처리한 주사기에 혈액을 채취하였다.

### 3. 혈액의 분석 및 BUN 측정

채혈한 혈액의 혈색소량, 적혈구 수 및 hematocrit는 CELL-DYN(model 1300, Abbott Diagnostics,

USA)으로 측정하였다. 신기능 변화의 지표로 혈액 urea nitrogen(BUN) 농도를 Diagnostic Kit(535-B, Sigma, USA)를 이용하여 535nm의 파장에서 비색정량하였다.

#### 4. 혈장 ANP 농도 측정

혈장 ANP 농도 측정을 위해 채혈한 혈액 2mL을 4°C에 보관한 혈액보존액(EDTA, 1mg/mL; phenylmethyl sulphonyl fluoride, 10mM; aprotinin, 500 KIU/mL; soybean trypsin inhibitor, 50 BAEE U/mL)과 혼합한 후 즉시 4°C에서 원심분리(1,000×g, 5 분)하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장 1mL을 Sep Pak C18 cartridge(Waters Associates, USA)를 통과시키고, 60% acetonitrile과 0.1% trifluoroacetic acid로 유효 성분을 추출하여 농축 건조한 후 -20°C에 보관하였다가 방사면역법(radioimmunoassay)을 이용한 ANP Kit(RPA 512, Amersham Life Science, UK)로 정량하였다.

#### 5. 조직 ANP mRNA 발현 측정

ANP 합성단계의 변동을 파악하고자 ether 마취에서 복부 절개하여 신장을 적출하였으며, 흉골정중절개로 흉곽을 개방한 후 심장을 적출하였다. 심장은 우심방과 좌심실을 분리하였다. 그리고 실험동물의 머리를 자른 후 빠른 시간내에 뇌를 적출하여 시상하부를 분리 채취하였다. 적출한 각 조직에 2mL의 RNazol™ B(Biotecx Laboratories, USA)를 넣고 Polytron (PT1200, Kinematica AG, Switzerland)으로 조직을 균질화 시킨 후 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 diethylpyrocarbonate를 처리한 중류수에 녹여 UV spectrophotometer(DU650, Beckman, USA)로 260nm 파장에서 RNA 농도를 측정하고, -20°C에 보관하였다가 사용하였다. 이상에 열거한 시약은 Sigma(USA) 제품을 사용하였다.

ANP mRNA를 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'-CTGAGTATGTCGTGG-

AGTCT-3'; antisense : 5'-ACAACCTGGTCCTC-AGTGTA-3')의 두 종류를 이용하였다. RT-PCR의 cycle 및 온도조건은 이 등<sup>5)</sup>과 같은 방법으로 하였으며, DNA thermal cycler(Hybaid OmniGene, UK)로 <sup>32</sup>P-dCTP 동위원소를 사용한 RT-PCR을 시행하였다. RT-PCR 산물은 5% acrylamide gel에서 전기영동하여, 이를 현상 필름에 노출시켜 현상한 후 음영농도계측기(Gel Doc 1000, Biorad, USA)를 이용하여 각 띠의 음영의 정도와 면적을 측정하였다. ANP mRNA의 값은 각각의 GAPDH mRNA에 대한 비로 나타냈으며, sham+HS 쥐, NPX 쥐, 및 NPX+HS 쥐의 각 조직별 ANP mRNA를 sham 쥐에 대한 상대적인 값으로 표시하였다.

#### 6. 통계학적 자료 처리

측정한 각각의 자료는 평균과 표준오차로 표시하였으며, 각 실험군 사이의 결과 비교는 Student's t-test를 통해 유의성을 검정하였고, 통계학적 유의성은 p값이 0.05 미만으로 정하였다.

### 결 과

신부분절제 수술 혹은 모의 수술 후 8주에 관찰한 각 조건별 생물학적 자료들은 Table 1과 같다. 평균 동맥압은 고염분을 섭취한 쥐들에서 평균적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 NPX+HS 쥐의 평균 동맥압은 sham 쥐의  $82.4 \pm 4.30$ mmHg에 비해  $101.3 \pm 4.37$ mmHg로 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 심박수는 고염분 섭취 쥐에서 약간 증가하는 경향이 있었지만, 각 실험군들 사이에 유의한 차이는 없었다.

혈색소량은 sham 쥐에 비해 신절제된 쥐들이 대체로 낮은 경향이 있었지만 각 실험군 사이에 유의한 차이는 없었다. 적혈구수는 NPX 쥐들에서 sham 쥐에 비해 유의하게( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었고 각 군들 사이에서 섭취한 염분량에 따른 차이는 없었다. Hematocrit치도 신절제된 쥐들에서 sham 쥐에 비해 감소하였으며, NPX 쥐에서 sham 쥐보다 유의한( $p < 0.05$ ) 감소가 있었다.

수술 후 8주 동안의 체중 증가율은 신절제된 쥐들이 sham 쥐에 비해 증가가 작았고, NPX 쥐가 sham 쥐에 비해 체중 증가가 유의하게( $p < 0.05$ ) 작았다.

**Table 1. Biological Parameters of Sham and Subtotal Nephrectomized(NPX) Rats after Normal or High Salt(HS) Diet**

Parameters	Sham	Sham+HS	NPX	NPX+HS
Mean arterial pressure(mmHg)	82.4±4.30	97.7±6.36	82.8±6.42	101.3±4.37*
Heart rate/min)	198.4±23.27	243.3±11.67	204.3±6.12	222.0±16.62
Hemoglobin(g/dL)	14.2±0.14	13.8±0.47	12.0±1.02	13.4±0.62
Red blood cell( $10^6/\text{mm}^3$ )	7.7±0.18	8.2±0.13	6.5±0.45*	7.1±0.23†
Hematocrit(%)	35.5±0.33	38.5±1.55	33.9±0.50*	34.8±1.47
Increase of body weight(%)	13.6±3.12	15.0±1.55	5.0±1.54*	8.5±2.43
Water intake(mL/day)	43.8±2.39	64.7±8.67*	83.2±4.03†	118.8±12.97††
Blood urea nitrogen(mg/dL)	20.1±1.92	24.1±1.55	51.6±2.96†	40.5±8.84*

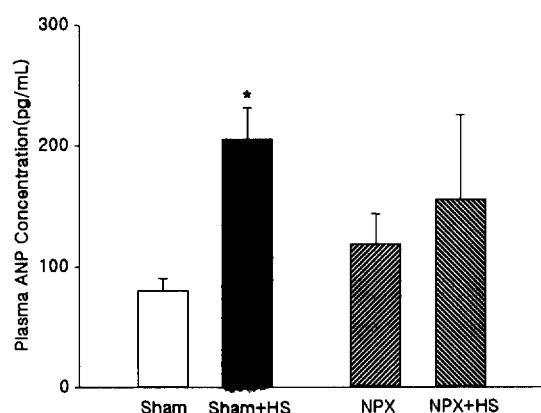
Data are mean ± standard error(n=5)

\*p<0.05 vs. sham; †p<0.01 vs. sham; \*p<0.05 vs. sham+HS; †p<0.05 vs. NPX rats

NPX+HS 쥐는 NPX 쥐에 비해서 조금 더 체중이 증가하는 경향이었다. 일일 수분 섭취량은 최종 수술 후 마지막 1주일간 수분 섭취량의 1일 평균치를 기록하였으며, 수분 섭취량이 sham+HS 쥐(p<0.05), NPX+HS 쥐(p<0.01)과 NPX+HS 쥐(p<0.01) 모두에서 sham 쥐에 비해 유의한 증가를 보였다. 또한 NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐와 NPX 쥐에 비해 유의하게(p<0.05) 증가하였다. BUN 농도는 신절제된 NPX 쥐들이 sham 쥐보다 크게 증가하였으며, sham 쥐에 비해 NPX 쥐(p<0.01)과 NPX+HS 쥐(p<0.05)에서 유의하게 증가하였지만 섭취한 염분량에 따른 차이는 없었다.

혈장 ANP 농도는 고염분 섭취 쥐가 정상 염분 섭취 쥐보다 증가하였다. Sham+HS 쥐는 혈장 ANP 농도가 206±25.9pg/mL로 sham 쥐의 80±10.3pg/mL에 비해 유의하게(p<0.05) 증가하였다. NPX 쥐에서도 증가 경향이 있었지만 sham 쥐와 유의한 차이가 없었으며, NPX 쥐의 119±24.8pg/mL과 NPX+HS 쥐의 156±69.6pg/mL 사이에 유의한 차이는 없었다(Fig. 1).

Sham 쥐, 신부분절제 쥐, 정상 염분 섭취 쥐 그리고 고염분 섭취 쥐에서 ANP의 합성단계의 변동을 파악하기 위해 시행한 우심방, 좌심실, 시상하부 및 신장의 ANP mRNA의 변동 양상은 조직에 따라 차이가 있었다. 우심방의 ANP 합성은 sham 쥐에서의 발현을 기준으로 해서 관찰하면 혈장 ANP 농도의 변동과 유사하게 고염분 섭취 쥐에서 평균적으로 증가하는 경향이었다. 우심방의 ANP mRNA 발현을 sham 쥐와 비교하면 sham+HS 쥐와 NPX+HS 쥐에서

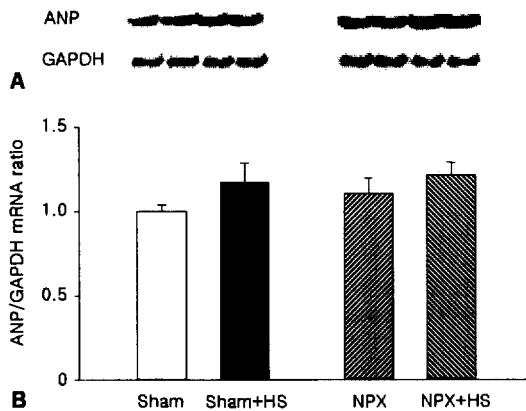


**Fig. 1.** Plasma concentration of atrial natriuretic peptide(ANP) in sham and subtotal nephrectomized(NPX) rats after normal or high salt(HS) diet. Data are collected at 8 weeks after surgical operation. Data are mean and standard error of five rats in each group. \*p<0.05 vs. sham rats.

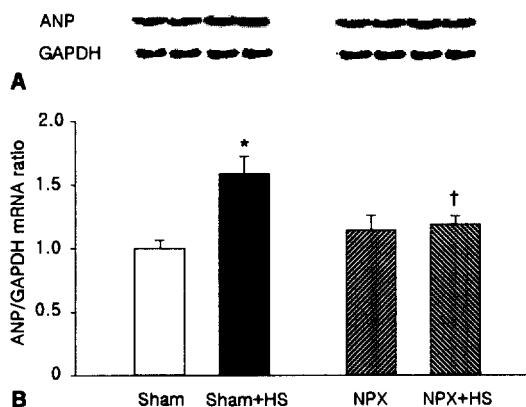
각각 18%와 22% 증가하였으며, NPX 쥐는 11% 증가하였다(Fig. 2).

좌심실의 ANP mRNA 발현은 sham 쥐에 비해 모든 실험군에서 증가하는 경향이었으며, 특히 sham+HS 쥐에서 평균 59%의 유의한(p<0.05) 증가를 보였다. 하지만 NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐에 비해 오히려 유의하게(p<0.05) 감소되었다(Fig. 3).

시상하부의 ANP mRNA는 신절제된 NPX 쥐와 NPX+HS 쥐에서 대조 sham 쥐에 비해 각각 15% 및 14% 감소하는 경향이었으며, 특히 NPX+HS 쥐는 sham+HS 쥐에 비해 유의한(p<0.01) 발현의 저하를 나타냈다(Fig. 4).

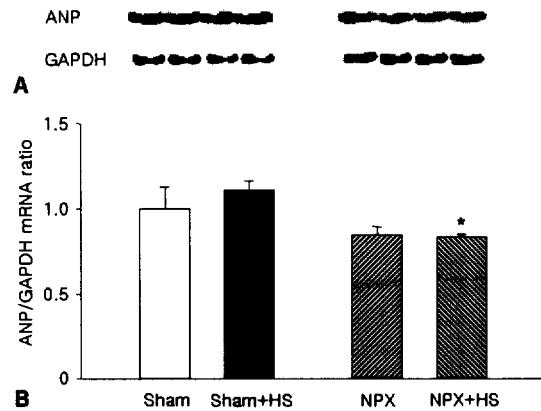


**Fig. 2.** ANP mRNA expression from the right atrium in sham and subtotal nephrectomized (NPX) rats after normal or high salt(HS) diet. Data are collected at 8 weeks after surgical operation. (A) Representative autoradiograms from four groups. (B) The relative mRNA levels are mean and standard error of five rats in each group. The density of each RNA sample for ANP was normalized to the GAPDH mRNA. The mean corrected density values were further divided by those of the sham rats.

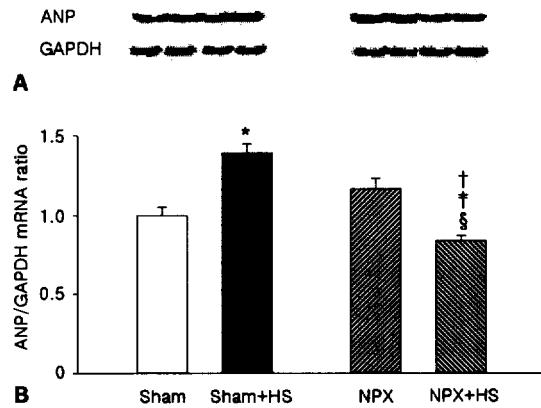


**Fig. 3.** ANP mRNA expression from the left ventricle in sham and subtotal nephrectomized (NPX) rats after normal or high salt(HS) diet. Data are collected at 8 weeks after surgical operation. (A) Representative autoradiograms from four groups. (B) The relative mRNA levels are mean and standard error of five rats in each group. \* $p<0.05$  vs. sham; † $p<0.05$  sham+HS rats.

신장에서의 ANP 합성은 sham 쥐에 비해 고염분을 섭취한 sham+HS 쥐에서 평균 39% 유의하게( $p<0.01$ ) 증가하였다. 하지만 신절제 후 고염분을 섭취한 NPX+HS 쥐는 sham 쥐( $p<0.05$ ), sham+HS 쥐



**Fig. 4.** ANP mRNA expression from the hypothalamus in sham and subtotal nephrectomized (NPX) rats after normal or high salt(HS) diet. Data are collected at 8 weeks after surgical operation. (A) Representative autoradiograms from four groups. (B) The relative mRNA levels are mean and standard error of five rats in each group. \* $p<0.01$  vs. sham+HS rats.



**Fig. 5.** ANP mRNA expression from the kidney in sham and subtotal nephrectomized(NPX) rats after normal or high salt (HS) diet. Data are collected at 8 weeks after surgical operation. (A) Representative autoradiograms from four groups. (B) The relative mRNA levels are mean and standard error of five rats in each group. \* $p<0.05$ , † $p<0.01$  vs. sham rat; ‡ $p<0.01$  vs. sham+HS rat; § $p<0.01$  vs. NPX rats.

( $p<0.01$ ) 그리고 NPX 쥐( $p<0.01$ ) 모두에 비해 유의하게 ANP 합성이 저하되었다(Fig. 5).

## 고 찰

나트륨은 세포외액의 중요한 용질 중의 하나이며, 세포외액량을 결정하는데 큰 역할을 담당한다. 정상 상태에서는 섭취하는 나트륨의 양이 다양해도 신장에서 나트륨 배설이 정밀하게 조절되어 항상 일정한 나트륨량과 세포외액량이 유지되지만, 신부전 환자의 나트륨 균형은 병의 심한 정도에 따라 차이가 생기므로 신부전 환자에서 나트륨 섭취는 중요한 제한 요소이다<sup>6)</sup>. 신부전 상태에서는 기능을 하는 신원의 수적 감소로 전체 사구체 여과율이 감소하여 체내 나트륨량의 축적과 혈액량의 증가가 초래되어 고혈압이 유발될 수 있으며<sup>18)</sup>, 이런 상황에서는 남아있는 신원의 기능적 향상을 통해 단위 신원당 나트륨 배설을 촉진시키고, 혈관 평활근의 확장을 강화시키는 생체의 보상 반응이 생기는데 이 작용이 ANP를 통해 매개된다는 것이 소개되고 있다<sup>2, 6, 19)</sup>.

ANP는 처음에 심방의 심근세포에서 분비된다는 것이 알려진 이후로<sup>9)</sup>, 세포외액량 증가<sup>18)</sup>, 울혈성 심부전과 본태성 고혈압<sup>20)</sup>, 고염분 섭취<sup>2)</sup> 그리고 만성신부전<sup>3)</sup> 등에서 인체 혹은 실험동물의 심방에서 분비가 증가되어 혈중 ANP 농도가 증가함이 보고되고 있다. 이런 ANP 분비의 증가는 대체로 체내 혈액량의 증가에 의해 심방의 신전이 생길 수 있는 상황에서 발생되며<sup>14)</sup>, 신장에 대해 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 하여 결국 체내의 혈액량을 감소시키고 혈압을 강하시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>8, 21)</sup>.

이 실험에 이용한 5/6 신부분절제술을 시행한 실험 쥐에서 sham 쥐에 비해서 혈액의 혈색소량, 적혈구 수와 hematocrit치 및 체중 증가율의 감소, 그리고 1일 수분 섭취량과 BUN 농도의 증가는 신부전 환자에서 임상적으로 관찰되는 소견과 일치하여 이 방법이 만성신부전의 실험적 모형으로 타당하다고 생각된다. 그리고 평균 동맥압은 sham 쥐에 비해 NPX 쥐에서는 뚜렷한 변동이 없는 반면에, 고염분을 섭취한 NPX+HS 쥐에서 동맥압이 평균적으로 약 20mmHg 증가하는 유의한 결과를 보인 것은 이 5/6 신부분절제술 모형에서 신부전을 유도하는데 있어 고혈압이

중요한 인자로 작용한 것이라 생각된다<sup>1)</sup>. 이는 신부분절제술 후 나트륨 섭취량에 따라 동맥압의 증가폭이 차이가 생긴다는 보고<sup>14)</sup>와 일치하며 신절제술 후에 고염분 섭취에 의해 체액량의 증가가 초래되어 신장에 더 많은 부담을 준 것으로 보인다<sup>22)</sup>. 실제로 신부분절제술만으로는 8주 동안의 관찰에서 초기 1주일에 동맥압의 증가이외에는 유의한 변동을 관찰할 수 없었다<sup>4)</sup>. 신기능 장애의 지표로 이용되는 BUN 농도는 sham 쥐에 비해 NPX 쥐가 유의한 증가를 보여 신손상에 의한 만성신부전의 모형이 잘 확립된 것을 표현하고 있었으며<sup>5)</sup>, 신부분절제술 후 고염분 섭취 쥐의 BUN 농도가 신부분절제 후 정상 염분 섭취 쥐에 비해 평균적으로 오히려 감소한 것은 고염분 섭취로 인한 세포외액량의 증가에 의한 결과로 생각된다<sup>23)</sup>.

이번 실험에서 sham 쥐에 고염분을 섭취시키면 ANP 농도가 유의하게 증가하였다. 정상상태에서 고염분 섭취시 혈중 ANP 농도의 변동을 관찰한 결과 인체<sup>8, 24)</sup> 혹은 실험동물<sup>21, 23, 25, 26)</sup>에서 ANP 농도가 증가한다는 보고가 많으며, 이번 실험의 결과와 일치되는 소견이다. 물론 정상 신기능하에서 염분 섭취의 증가는 신장을 통해 정교하게 조절되겠지만 앞서 기술한 보고들<sup>23, 26)</sup>과 같이 고염분 섭취에 의해 어느 정도 체액량이 증가한 것이 ANP 분비를 촉진시켜 체내 나트륨량을 조절한 것으로 생각된다. 하지만 보고자들에 따라 고염분 섭취시 혈장 ANP 농도의 변동에 일정한 결과를 보이지 않는 이유로 투여한 염분량과 투여 기간 그리고 염분 투여전의 개체 상태에 따라 차이가 생길 수 있다는 견해도 있다<sup>12, 14)</sup>.

5/6 신부분절제술을 시행한 후 혈장 ANP 농도의 변동을 관찰한 결과, 고염분을 섭취시킨 NPX+HS 쥐에서는 정상 염분을 섭취한 NPX 쥐에 비해 평균적으로 더 증가하였다. 신부분절제술로 만성신부전을 유도한 후 고염분을 섭취시켜도 혈장 ANP 농도가 증가한다는 보고들<sup>2, 14, 22)</sup>이 대부분이다. 만성신부전에서 이런 혈장 ANP 증가의 원인은 여러 가지 요인들이 작용한다. 즉, 신장실질 크기의 감소에 대한 보상작용과 신장을 통한 배설 기능의 저하에 의한 체액량 증가로 인해 ANP 분비의 증가<sup>3)</sup>, 신장에서의 ANP 대사의 저하<sup>27)</sup>와 ANP 제거 수용체의 down regulation<sup>7)</sup>으로 혈장 ANP 농도가 증가하는 경향을 보인 것으로 생각된다. 그리고 신절제 후 고염분 섭취 쥐에서 혈장 ANP 농도가 좀더 증가한 것은 만성신부전의

효과에 더하여 고염분 섭취만으로도 신장의 ANP 제거 수용체가 down regulation 되며<sup>26, 28)</sup>, 나트륨 섭취에 의한 체액량의 증가 효과<sup>22)</sup> 그리고 혈장 renin 활성도와 aldosterone 조절계의 억제 효과<sup>8, 11, 24)</sup>가 함께 나타난 결과라 생각된다. 하지만 단순히 혈장 농도의 변동만으로 ANP의 조절 작용을 전부 해석하는 것은 한계가 있을 것이라 생각되며, 체액과 전해질 조절에 관여하는 중요 장기에서의 ANP 조절 기능을 종합적으로 관찰하는 것이 ANP의 기능을 파악하는데 중요할 것이라는 의견이 소개되고 있다<sup>16, 17)</sup>.

만성신부전과 고염분 섭취에 따른 우심방, 좌심실, 시상하부 및 신장에서 ANP 합성의 변동은 조직에 따라 차이가 있었다<sup>5)</sup>. 우심방에서는 ANP mRNA가 sham 쥐에 비해 유의한 차이는 없이 증가하는 양상이었다. 좌심실의 ANP mRNA가 sham 쥐에서 고염분 섭취로 증가되었지만, 같은 정도의 고염분 섭취라도 신부분절제된 쥐에서는 sham 쥐에 비해 유의하게 발현이 저하되었다. ANP는 심방에 국한된 호르몬이 아니며 심방이외의 조직에서도 합성 분비되며, 심장의 ANP 합성 및 분비의 가장 잘 알려진 자극은 심장의 신전이다<sup>10)</sup>. 지금까지 ANP 합성에 관한 연구 중에서는 신부분절제술에 의한 만성신부전 모형에서는 나트륨과 수분의 축적에 의한 혈액량의 증가와 혈압의 증가가 발생되어 우심방 ANP 합성이 증가할 것이라는 보고<sup>14)</sup>가 있는 정도이고 참고자료가 회소하다. 좌심실의 경우에서도 만성신부전 모형보다는 심장비후가 발생되는 울혈성 심부전<sup>29)</sup>과 신성고혈압<sup>15)</sup> 등의 조건에서 ANP 합성이 증가한다는 보고들이 있다. 이 실험에서 심장의 ANP mRNA가 신절제술을 받은 쥐와 고염분 섭취 쥐에서 약간 증가하는 정도의 변동을 보인 것은 만성신부전의 진행 그리고 염분 섭취량의 증가에 따른 혈액량의 증가 혹은 혈압(심장 후부하)의 증가에 의해 심방과 심실의 ANP 합성이 같이 증가된 것으로 생각된다<sup>30)</sup>. 하지만 이번 실험의 2주 동안의 고염분 섭취 조건에 의해 앞서 보고한 울혈성 심부전이나 신성 고혈압과 같이 장시간의 걸쳐서 발생된 심장비후가 초래되었을 것이라고 판단되지 않는다<sup>15, 29, 30)</sup>. 그리고 신절제 후 고염분을 섭취시키면 정상 쥐에 고염분을 섭취한 것에 비해 좌심실의 ANP 합성이 저하된 것은 ANP가 주로 초기 반응에 관여하며 수주 이상 장기적으로 염분을 투여하면 ANP 이외의 renin과 aldosterone 등 다른 호르몬이나 신경성 조절이 주

작용기전이 된다는 사실도 고려해야 할 점이다<sup>11, 12)</sup>.

시상하부에서는 ANP mRNA의 발현이 sham 쥐들의 경우에 비해 NPX 쥐에서 감소하는 경향이었으며, 특히 신절제 후 고염분을 섭취한 쥐에서 더 감소하였다. 중추 신경계에서는 시상하부에서 ANP가 가장 많이 발견되면서 신경전달물질 혹은 신경매개물질로 작용하여 체액량과 혈압의 조절에 역할을 한다<sup>25, 31)</sup>. 시상하부의 ANP는 말초 조직에서의 작용과 다르며<sup>25)</sup>, 신장을 통한 전해질 배설에는 직접적인 연관이 없으면서<sup>32)</sup>, 혈액량과 삼투질 농도 조절에 관여하는 시상하부 신경의 활동성을 억제시킨다<sup>31)</sup>. 뇌에서 angiotensin II는 수분 섭취를 증가시키고 ANP에 대해 길항적으로 작용을 하며<sup>33)</sup>, 중추적으로 ANP를 주입하면 염분 섭취량이 감소한다<sup>34)</sup>. 그리고 실험적으로 만성신부전 쥐의 뇌에 ACE 억제 약물을 주입하면 뇌의 ANP 합성이 증가하며, angiotensin과 같은 길항 호르몬에 의해 뇌에서의 ANP 역할이 조절되는 것이 증명된 바 있다<sup>16)</sup>. 이번 실험의 신부분절제술을 시행한 쥐에서 염분 섭취량과는 관계없이 수분 섭취량이 sham 쥐에 비해 유의하게 증가하였고, 시상하부의 ANP 합성이 감소하였다. 이 결과는 이 실험에서 직접 측정을 하지는 않았지만, sham+HS 쥐와는 다르게 만성신부전에 의해 체내 나트륨의 축적으로 삼투질 농도가 증가되면서 중추신경계에서 ANP와 반대 작용을 하는 항이뇨호르몬 조절계와 angiotensin 조절계의 역할이 항진되어 시상하부의 ANP 조절계의 역할이 저하된 결과로 생각된다<sup>5, 16, 33)</sup>.

신장에서는 sham+HS 쥐에서 sham 쥐에 비해 유의한 ANP mRNA 발현의 증가가 있었다. 하지만 신절제 후 고염분을 섭취한 쥐에서는 다른 모든 실험 군에 비해 ANP mRNA가 유의하게 감소되었다. 신장 이외의 장소로 신장이 ANP 합성에 국소적으로 관여하며<sup>17)</sup>, 신장에서 합성된 ANP의 기능은 신장에서 합성된 ANP처럼 체액량 조절을 하는 기능과 함께 paracrine 혹은 autocrine 기능으로 renin이나 angiotensin II와 같은 혈관수축물질에 대해 반대 작용을 하여 신혈류량을 유지하는 신혈류의 자동조절에 관여한다. 실제로 신장을 통한 나트륨 배설의 조절에 혈장 ANP 농도보다 신장에서 합성된 ANP가 더 밀접한 관련이 있다<sup>17)</sup>. 이번 실험에서 sham 쥐에 고염분을 섭취시키면 신장의 ANP 합성이 증가하였는데, 이는 나트륨 배설의 촉진을 위해 국소적으로 ANP 합성이

증가된 현상으로 생각된다<sup>17)</sup>. 신절제만 시행한 NPX 쥐에서 같은 정도의 염분을 먹은 sham 쥐에 비해 신장의 ANP 합성이 약간 증가하고 동맥압이 유의하게 변동되지 않았던 것은 만성신부전이 유도되는 과정에서 생긴 나트륨의 축적 및 체액량의 증가에 대한 보상작용<sup>35)</sup>과 혈압 상승에 대한 억제작용<sup>19)</sup>이 함께 표현된 결과로 생각된다. 하지만 NPX 쥐에서 고염분을 섭취시키면 신장의 ANP 합성이 유의하게 감소하는 결과를 보였는데, 이 결과와 직접 비교할 자료는 아직 없는 실정이다. 지금까지 DOCA salt를 먹인 쥐에서 신장 ANP mRNA 변동에 관한 보고 중에는 ANP 합성이 증가<sup>35)</sup> 혹은 감소<sup>36)</sup>한다고 하여 결과들이 일정하지 않다. 특발성 고혈압 쥐에서는 정상 쥐와는 다르게 고염분 섭취에 의해 혈장 ANP 농도는 변동이 없으면서 혈장 renin 활성도와 aldosterone 농도가 크게 증가한다고 보고하였다<sup>37)</sup>. 이 결과는 각 실험동물의 조건에 따라서 고염분 섭취에 대한 ANP의 조절에 차이가 있는 것으로 보인다. 그러므로 이 실험의 신부분절제술 시행 후 고염분을 섭취한 쥐에서 신장 ANP 합성이 감소하고 동맥압이 증가한 것으로 봄, 최소한 신장에서 기존에 알려진 ANP의 체액량 및 혈압의 조절 역할이 저하되어서 나타난 결과로 해석된다. 고염분 섭취에 의해 신장 ANP의 역할이 감소된 것이 신장에 부담을 가중시켜 체액량의 증가와 고혈압을 유발시키는 요인으로 작용할 것이라 생각한다<sup>22, 36)</sup>.

이상의 결과로 신부분절제술로 유도된 만성신부전 환쥐에서 고염분 섭취는 혈장 및 심장 ANP에는 유의한 변동이 없이 신장에서의 ANP 합성을 감소시키고 체액 및 전해질 균형에 관여하는 신장 ANP 조절계의 역할을 저하시키는 요인으로 작용할 것이라 생각된다.

= Abstract =

**Changes of mRNA and Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide in Subtotal Nephrectomized Rats after High Salt Intake**

Moon Gyoo Kang, 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

High salt intake produces volume expansion and electrolyte imbalance in chronic renal failure and modifies the synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide(ANP) to compensate the abnormalities in fluid and sodium handling. This study was performed to investigate the effect of high salt intake on modulation of cardiac and noncardiac ANP mRNA as well as plasma ANP levels in 5/6 subtotal nephrectomized (NPX) rats as a model of chronic renal failure.

Adult male Sprague-Dawley rats were divided into sham and NPX rats. NPX rats were induced by 2/3 pole ligation and contralateral nephrectomy. Sham and NPX rats had access to normal chow with tap water for 8 weeks or normal chow with 0.45% NaCl solution(HS) for last 2 weeks. Plasma ANP levels were measured by radioimmunoassay. ANP mRNA from the right atrium, left ventricle, hypothalamus and kidney were analyzed by RT-PCR with <sup>32</sup>P-dCTP at 8 weeks after surgical operation in both sham and NPX rats. Blood urea nitrogen(BUN) was measured to evaluate impaired renal function. Body weight, daily water intake, hemoglobin, red blood cell, hematocrit, arterial pressure and heart rate were also monitored.

Arterial pressure in NPX+HS rat was significantly increased. Both percent increase of body weight and hematologic findings were decreased in NPX rats. Daily water intake was increased in NPX rats, especially in NPX+HS rat. BUN also increased in NPX rats. Plasma ANP concentration was significantly increased in sham+HS rat, but other significant increases were not shown in NPX rats. The levels of right atrial ANP mRNA represented the increasing trend like as plasma ANP. Left ventricular ANP mRNA was increased in sham+HS rat, while the level in NPX+HS rat was decreased comparing with that of sham+HS rat. Hypothalamic ANP mRNA was decreased in NPX+HS rat. In the kidney, the level of ANP mRNA in sham+HS rat was increased comparing with sham rat, but ANP synthesis in NPX+HS rat was significantly lower than in sham, sham+HS and in NPX rats.

These findings represent that the high salt intake in NPX rat does not alter the plasma levels and cardiac synthesis of ANP but suppresses the renal ANP mRNA. The diminished renal ANP synthesis may attenuate the regulatory role of ANP system in the kidney and result in volume expansion and hypertension.

**Key Words :** High salt, Subtotal nephrectomy, ANP mRNA, Plasma ANP

## 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, p1-28, 1993
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 신영호, 배재훈, 강문규, 송대규, 김현철, 박원균 : 실험적 만성신부전 환쥐에서 심방이뇨호르몬의 변동. *대한신장학회지* 17:16-24, 1998
- 5) 이원기, 박원균, 홍영수, 송대규, 배재훈 : 만성신부전 쥐에서 심방 및 심방의 조직 ANP mRNA의 발현. *대한신장학회지* 19:808-818, 2000
- 6) Shemin D, Dworkin LD : Sodium balance in renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:128-132, 1997
- 7) Luk JK, Wong EF, Wong NL : Down regulation of atrial natriuretic factor clearance receptors in experimental chronic renal failure rats. *Am J Physiol* 269:H902-H908, 1995
- 8) Facchini FS, DoNascimento C, Reaven GM, Yip JW, Ni XP, Humphreys MH : Blood pressure, sodium intake, insulin resistance, and urinary nitrate excretion. *Hypertension* 33:1008-1012, 1999
- 9) De Bold AJ : Heart atrial granularity effects of changes in water electrolyte balance. *Proc Soc Exp Biol Med* 161:508-511, 1979
- 10) Ruskoaho H : Atrial natriuretic peptide: Synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 44:479-602, 1992
- 11) Wolf K, Kurtz A : Influence of salt intake on atrial natriuretic peptide gene expression in rats. *Pfugers Arch* 433:809-816, 1997
- 12) Lattion AL, Aubert JF, Fluckiger JP, Nussberger J, Waeber B, Brunner HR : Effect of sodium intake on gene expression and plasma levels of ANF in rats. *Am J Physiol* 255:H245-H249, 1988
- 13) Jin H, Chen YF, Yang RH, Meng QC, Oparil S : Impaired release of atrial natriuretic factor in NaCl-loaded spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 11:739-744, 1988
- 14) Wong NL, Wong EF : Effect of dietary sodium on atrial natriuretic factor released in rats with chronic renal failure. *Nephron* 61:464-469, 1992
- 15) 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
- 16) Geiger H, Bahner U, Kraus I, Hoffmann M, Palikovits 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.
- 17) 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
- 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) Melo GL, Veress AT, Chong CK, Pang SC, Flynn TG, Sonnenberg H : Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice : Potential role of abnormal plasma renin activity. *Am J Physiol* 274:R255-R261, 1998
- 20) 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
- 21) Lee J, Kim JK, Choi KC, Gill WS : High salt intake attenuates the development of hypertension in two-kidney, one-clip Goldblatt rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 197:181-185, 1991
- 22) Brandt MA, Fink GD, Chimoskey JE : Plasma atrial natriuretic peptide in conscious rats with reduced renal mass. *FASEB J* 3:2302-2307, 1989
- 23) 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
- 24) Sagnella GA, Markandu N, Shore AC, MacGregor GA : Effects of changes in dietary sodium intake and saline infusion on immunoreactive atrial natriuretic peptide in human plasma. *Lancet* 2:1208-1210, 1985
- 25) 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
- 26) Gauquelin G, Garcia R, Carrier F, Cantin M, Gut-

- kowska J, Thibault G, Schiffrian EL : Glomerular ANF receptor regulation during changes in sodium and water metabolism. *Am J Physiol* 254: F51-F55, 1988
- 27) Berg JA, Hayashi M, Fujii Y, Katz AI : Renal metabolism of atrial natriuretic peptide in the rat. *Am J Physiol* 255:F466-F473, 1988
- 28) Michel H, Backer A, Kramer HJ : Selective down regulation of rat renal clearance receptors for atrial natriuretic peptide by chronic high-salt intake : Study on isolated membrane using  $^{125}\text{I}$ -labelled c-atrial natriuretic peptide(4-23). *Clin Sci* 83:139-142, 1992
- 29) Ding J, Thibault G, Gutkowska J, Garcia R, Karabatsos T, Jasmin G, Genest J, Cantin M : Cardiac and plasma atrial natriuretic factor in experimental congestive heart failure. *Endocrinology* 121:248-257, 1987
- 30) 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
- 31) Haskins JT, Zingaro GJ, Lappe RW : Rat atriopeptin III alters hypothalamic neuronal activity. *Neurosci Lett* 67:279-284, 1986
- 32) 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
- 33) Reid IA : Actions of angiotensin II on the brain : Mechanisms and physiological role. *Am J Physiol* 246:F533-F543, 1984
- 34) Fitts DA, Thunhorst RL, Simpson JB : Diuresis and reduction of salt appetite by lateral ventricular infusion of atriopeptin II. *Brain Res* 348: 118-124, 1985.
- 35) 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
- 36) Ogawa T, Bruneau BG, Yokota N, De Bold ML, De Bold AJ : Tissue-specific regulation of renal and cardiac atrial natriuretic factor gene expression in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension* 30:1342-1347, 1997
- 37) Widimsky J, Kuchel O, Tremblay J, Hmet P : Distinct plasma aldosterone response to prolonged high-salt intake in hypertensive and normotensive rats. *J Hypertens* 9:241-247, 1991