

노화초기 백서 신장에서의 Nitric Oxide Synthase 발현

권계원 · 정현주¹

순천향대학교 의과대학 병리학교실
연세대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2003년 12월 9일
게재승인 : 2004년 3월 24일

책임저자 : 정 현 주
우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-361-5252
Fax: 02-362-0860
E-mail: jeong10@yumc.yonsei.ac.kr

*이 연구는 2000년도 연세대학교 의과대학
교수연구비로 이루어졌음.

Nitric Oxide Synthase Expression in Early Stage of Aging Rat Kidney

Kye Won Kwon and Hyeon Joo Jeong¹

Department of Pathology, Soonchunhyang University College of Medicine, Bucheon; ¹Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Nitric oxide synthase (NOS) has been suggested to have a role in renal injury of aging rats. **Methods :** Renal function and histology were compared between 12 month- and 7-9 week-old rats. Proliferating activity and cell death were evaluated by PCNA index and apoptosis. Three isoforms of NOS (eNOS, iNOS, and nNOS) were stained by immunohistochemistry. **Results :** Serum creatinine level was increased in old rats (1.0 mg/dL vs 0.5 mg/dL, $p=0.000$). 24 h proteinuria and urinary NO were comparable between the two groups. The percentage of global and segmental glomerulosclerosis increased in old rats (10.2 vs 19.2/mm², $p=0.019$) of old rats compared to that of young rats. However, no difference was observed in the number of TUNEL positive cells. eNOS was not stained in young and old rat kidney, whereas iNOS was stained in the interstitial inflammatory cells of old rats (0.3 vs 0.0 of young rats/mm², $p=0.188$). Macula densa nNOS staining significantly decreased in old rats compared to young rats (5.6 vs 9.5/mm², $p=0.009$). **Conclusions :** Proliferating activity is more affected than cell death with aging. Decreased nNOS expression without alteration of eNOS and iNOS expressions may implicate nNOS as a marker of renal injury in the early stage of aging.

Key Words : Kidney-Aging-Histology-Nitric Oxide Synthase

노화된 인체나 실험 동물의 신장은 기능적으로는 사구체 여과율과 신장 혈류가 감소하고 혈관 저항이 증가하며, 형태학적으로는 사구체 경화율이 증가하고 세뇨관의 위축과 사이질의 섬유화가 나타나는 현상을 보인다.¹⁻³ 신생아기의 인체는 사구체 여과율이 약 39 mL/min/1.73 m²이며, 2세경에는 성인의 수준으로 증가하여 30세까지는 약 140 mL/min/1.73 m²로 유지되다가 이후 매 10년마다 약 8 mL/min/1.73 m²씩 감소하는 것으로 알려져 있다.⁴ 신장의 혈류도 이와 유사한 경과를 밟아 감소하며 수질과 피질의 혈류 재분포가 일어나서 수질로의 혈류가 증가하게 된다.⁵ 신장의 나트륨 재흡수 능력이나 요 농축 및 회석 능력, 혈관 이완제에 대한 반응 등이 감소하고, 피질로의 혈류가 감소함에 따라 사구체의 퇴행 및 경화가 발생하게 된다. 따라서 사구체 경화, 모세혈관고리의 폐쇄 및 탈락 등이 특징적 관찰 소견이며, 이와 더불어 세뇨관 주위 모세혈관의 소실, 사이질내 염증세포의 침윤 및 섬유화 등의 손상을 관찰할 수 있다.

노화에 의한 신장의 손상 기전은 정확히 규명되어 있지 않으나, 산화성 스트레스의 증가가 중요한 요인 중의 하나일 것으로 지적

되고 있다. Reckelhoff 등⁶은 노화된 신장의 조직 내에서 지질의 과산화물을 나타내는 표지자로서 F₂-isoprostanes과 malonaldehyde가 증가되어 있고, 산화성 스트레스를 유발하는 후기 당화 산물(advanced glycosylation end-products)과 그 수용체(RAGE)의 상호 작용이 증가되어 있음을 보고하였다. 그리고 이러한 변화는 항산화제인 vitamin E에 의해서 부분적으로 억제된다고 보고한 바 있다. 이와 같은 산화성 손상 기전의 일종으로 산화질소(nitric oxide: NO)가 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있으나, 아직 이에 대한 보고는 많지 않은 실정이다. NO는 세포질 내에서 L-arginine으로부터 생성되는 유리 라디칼의 일종으로, 이 과정을 매개하는 nitric oxide synthase (NOS)는 두 가지 체질형(constitutive) NOS (endothelial, neuronal, 각각 eNOS, nNOS)와 유도형(inducible) NOS (macrophage/vascular smooth muscle, MAC-NOS, VSM-NOS)로 분류된다.⁷ 신장 내에서 eNOS는 사구체 모세혈관의 내피세포 및 들세동맥, 날세동맥과 소엽사이동맥의 내피세포, 세뇨관 상피세포 등에서 표현되며,⁸ nNOS는 밀집반과 사구체 상피세포 및 세뇨관 상피세포 등

에서 표현된다.⁹ 그리고 iNOS는 사구체 메산지움 세포 및 수질 내 상행 헨레고리(medullary thick ascending limb of Henle's loop)와 근위 세뇨관을 비롯한 세뇨관 상피세포에서 표현되는 것으로 보고되어 있다.¹⁰ 정상적으로 NO는 사구체의 혈액동학적 조절 및 여과 작용에 관여하며¹¹ 세뇨관에서의 나트륨 배설을 조절하는 생리적 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러나 병적인 상황에서 과량으로 생성된 NO는 superoxide radical과 신속하게 반응하여 peroxynitrite anion을 형성함으로써 지질, 단백질, DNA에 산화성 반응을 일으켜 세포 및 조직에 산화성 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴ 이와 같은 다량의 NO에 의한 신독성 기전은 면역 매개성 사구체 신염이나 허혈성 신부전, 조영제에 의한 신독성, 폐쇄성 요로 질환 및 이식 신장의 거부반응 등 다양한 신장 질환에서 보고되어 있다.^{15,16} 고혈압 동물 모델 및 인체의 사구체 질환 등에서 보고된 바에 의하면 생성된 NO의 효소적 근원에 따라서 신장에 대한 작용이 서로 상반될 수 있다고 한다. 즉, eNOS에 의하여 소량으로 생성된 NO는 위에 언급한 바와 같은 정상 생리 작용에 관여함으로써 신장 손상에 대한 보호 작용을 하는 것으로 생각되나, 병적인 조건 하에서 다양한 시토카인에 의해 iNOS 경로가 활성화됨으로써 다량의 NO가 생성되는 경우에는 오히려 신장의 손상을 유발할 수 있어 NOS의 '역할 전환(role switch)'이 가능하다고 보고되었다.¹³ 노화에 의한 신장 손상에서도 eNOS와 iNOS의 단백 표현이 서로 상반되게 보고된 바 있다. Thomas 등¹⁷은 노화된 백서 신장의 세뇨관 주위 모세혈관에서 eNOS의 단백 표현이 감소되었음을 보고한 바 있고, Reckelhoff 등¹⁸은 전체 신장 조직의 iNOS 단백 표현이 증가되어 있음을 보고한 바 있다. 또한 노화와 함께 nNOS의 양이 감소한다는 사실도 보고되었다.¹⁹ 현재까지 이들 보고 이외에는 노화에 의한 신장 손상의 기전으로서 NOS 아형의 표현 변화에 대한 연구가 없는 실정이며, 결론적으로 이들 NOS의 표현 변화가 신장의 NO 형성 및 산화성 손상에 어떠한 변화를 유발하는지에 대해서도 불명확하다.

따라서 본 연구에서는 노화초기 백서의 신장을 이용하여 소변 내의 NO의 농도를 측정하고 각 NOS 아형의 표현 양상을 살펴봄으로써, 노화에 의한 신장 손상에 있어서 NOS의 역할을 규명하고자 하였다.

재료와 방법

실험 동물

12개월령과 7-9주령의 Sprague-Dawley (SD) 웅성 백서(Harlan, Indianapolis, Indiana, USA) 각각 10마리씩을 '대한바이로링크'에서 구입하여 실험에 이용하였으며, 빛과 온도 및 사료 공급은 표준화된 조건대로 사육하였다.

소변 내 NO 및 단백질 측정

NO의 안정한 대사물질인 nitrite를 Griess 방법으로 측정하였다. 5% phosphoric acid에 용해된 1% sulfanilic acid와 0.1% N-naphthylethylene diamine dihydrochloride를 동량으로 혼합한 Griess 시약 500 μ L를, 동량의 샘플과 혼합하여 60°C에서 15분간 처치하였다. 그 다음 spectrophotometer (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech, England, UK)를 이용하여 546 nm에서 흡광도를 측정하고, NaNO₂를 이용한 표준 곡선에서 농도를 계산하였다. Nitrate는 nitrate reductase를 이용하여 nitrite로 전환한 후 동일한 방법으로 측정하였다.

소변 내 단백질량은 상표화되어 판매하는 발색 물질을 이용하여 Bradford 방법²⁰대로 측정하였으며, 우혈청 알부민을 표준 물질로 이용하였다.

신장의 조직 검사

적출된 반대측 신장을 10% 중성 포르말린에 고정시키고 파라핀에 포매하여 광학현미경 검사 및 면역조직화학 염색을 시행하였다.

광학현미경 검사로 파라핀에 포매된 검체를 2 μ m 두께로 절편하여 periodic acid-Schiff (PAS)염색을 시행하였다. 각각의 증례에서 100개의 사구체를 검색하여 전경화증과 국소 경화증을 보이는 사구체의 개수를 세었다. 사이질의 염증 세포 침윤과 섬유화의 정도는 0-3으로 반정량화하여 신피질내 사이질의 염증세포 침윤이나 섬유화가 없는 경우를 0으로, 25% 미만에서 관찰될 때를 1로, 25-50%에서 관찰될 때를 2로, 50% 이상에서 관찰될 때를 3점으로 하였다.

신장의 면역조직화학염색

면역조직 화학염색은 파라핀으로 포매된 조직을 4 μ m 두께로 연속 절편하여 poly-L-Lysine-coated 슬라이드에 부착하여 50°C에서 한 시간 건조시켰다. Xylene에서 파라핀을 제거하고 에틸 알코올에서 단계적으로 흡수한 후, 3% 과산화수소로 20분간 전처리하여 내인성 과산화 효소 활동을 차단하였다. 수세 후 citrate buffer에 담가 microwave에 10분간 가열하고 식힌 후 TRIS buffer (pH 7.6)에 10분간 처리하여 잔여 혈청을 제거하였다. 내인성 biotin을 차단시킨 후 ED-1 (Serotec, Indianapolis, IN, USA, 1:100), PCNA (Novocastra Lab Ltd, Benton Lane, UK, 1:50), mouse monoclonal anti-human eNOS antibody (BD transduction Laboratories, San Jose, CA, USA, 1:100), rabbit anti-rat iNOS antibody (Affinity Bioreagent, Golden, CO, USA, 1:1000), nNOS antibody (BD transduction Laboratories, San Jose, CA, USA, 1:100)를 도포하고 4°C 냉장고에서 하루 동안 반응시켰다. 음성 대조군으로는 신절편을

일차항체 대신 PBS를 도포하여 염색하였다. PBS buffer로 세척한 후 Streptavidine-biotin-peroxidase complex technique (LSABR 2 kit peroxidase, DACO, Carpinteria, CA, USA)을 이용하였으며 3,3-diaminobenzidine으로 발색하였다. 염색된 슬라이드의 분석에서 사구체는 30개를 세어 갈색으로 염색된 세포들 수에 대하여 사구체 하나당 양성 세포의 평균을 구하였다. 그리고 세뇨관-사이질은 $\times 200$ 배에서 0.25 mm^2 grids로 30 fields를 관찰하여 갈색으로 염색된 세포수를 모두 세어 mm^2

당 양성세포수로 표기하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL) assay

세포자멸사 정도를 알아보기 위하여 시행한 TUNEL assay는 Apoptag^R peroxidase in situ apoptosis detection kits (Cat # S7100, Intergen, CO, USA)를 이용하였다. 파라핀으로 포매

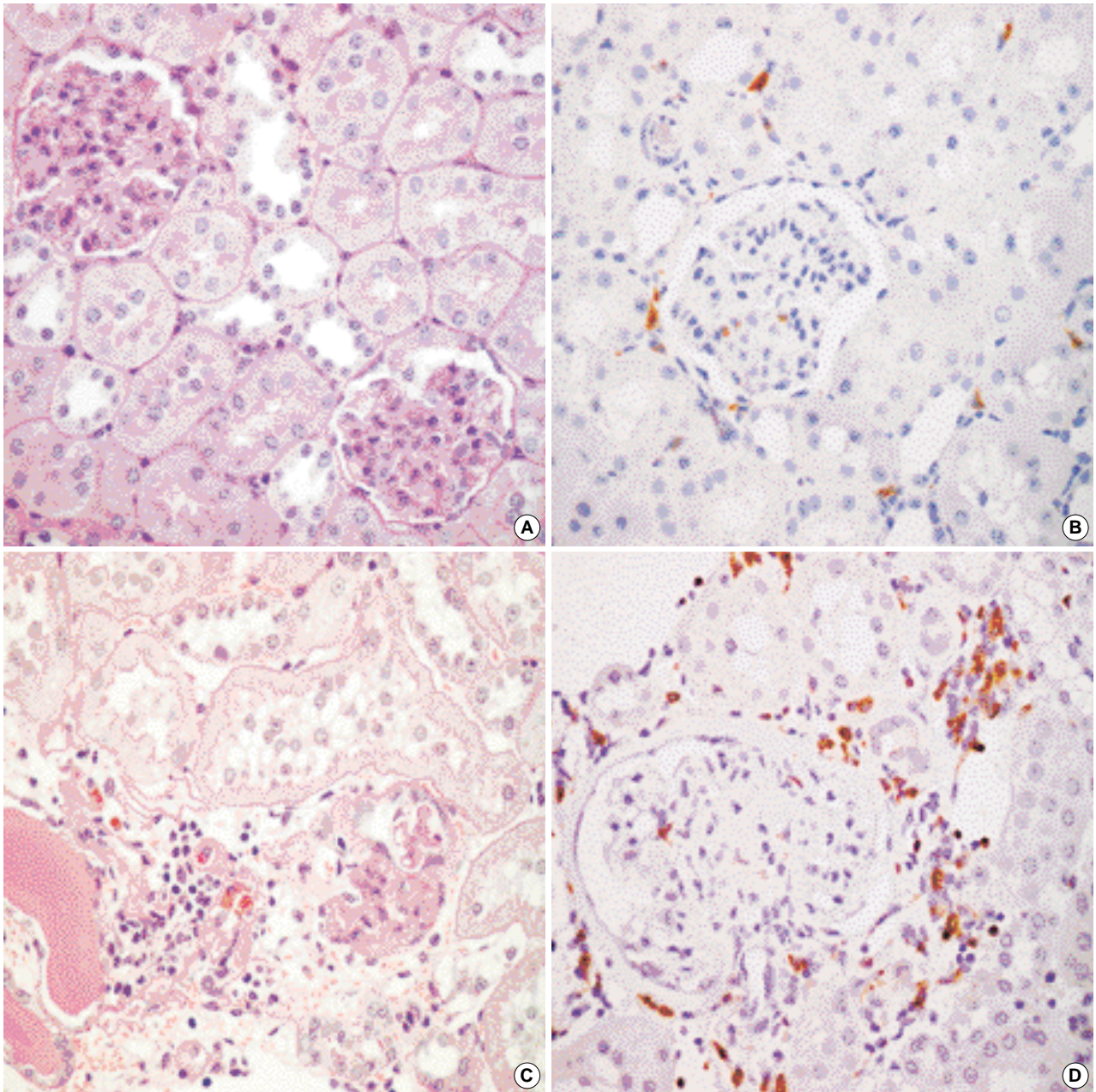


Fig. 1. Renal histology in old and young rats. (A) In young rats, glomeruli and tubulointerstitium are well preserved (PAS). (B) ED1 positive cells are rarely seen in the interstitium of young rats. (C) Segmental glomerulosclerosis and interstitial inflammation (PAS) and (D) increased number of ED1 positive cells are present in the old rats.

된 조직을 4 μm 두께로 절편하여 poly-L-Lysine-coated 슬라이드에 부착하여 50°C에서 한 시간 건조시켰다. 탈파라핀과 합수과정을 거친 후 Proteinase K를 37°C에서 10분간 처리한 다음 증류수로 수세하였다. 3% 과산화수소 용액에 5분간 반응시킨 후 equilibration buffer를 조직 위에 떨어뜨리고 플라스틱 덮개로 덮어 실온에서 10분간 반응시켰다. 플라스틱 덮개를 벗겨 남아 있는 용액을 제거한 후 TdT를 떨어뜨리고 플라스틱 덮개로 다시 덮어 37°C에서 1시간 반 동안 반응시켰다. 플라스틱 덮

개를 제거하고 working strength stop/wash buffer에 담가 37°C에서 10분간 두었다가 수세하고, Anti-digoxigenin-peroxidase를 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색하였다.

통계

통계처리는 SPSS를 이용하여 T-test를 하였으며, p 값이 0.05 이하인 경우 의의가 있는 것으로 보았다.

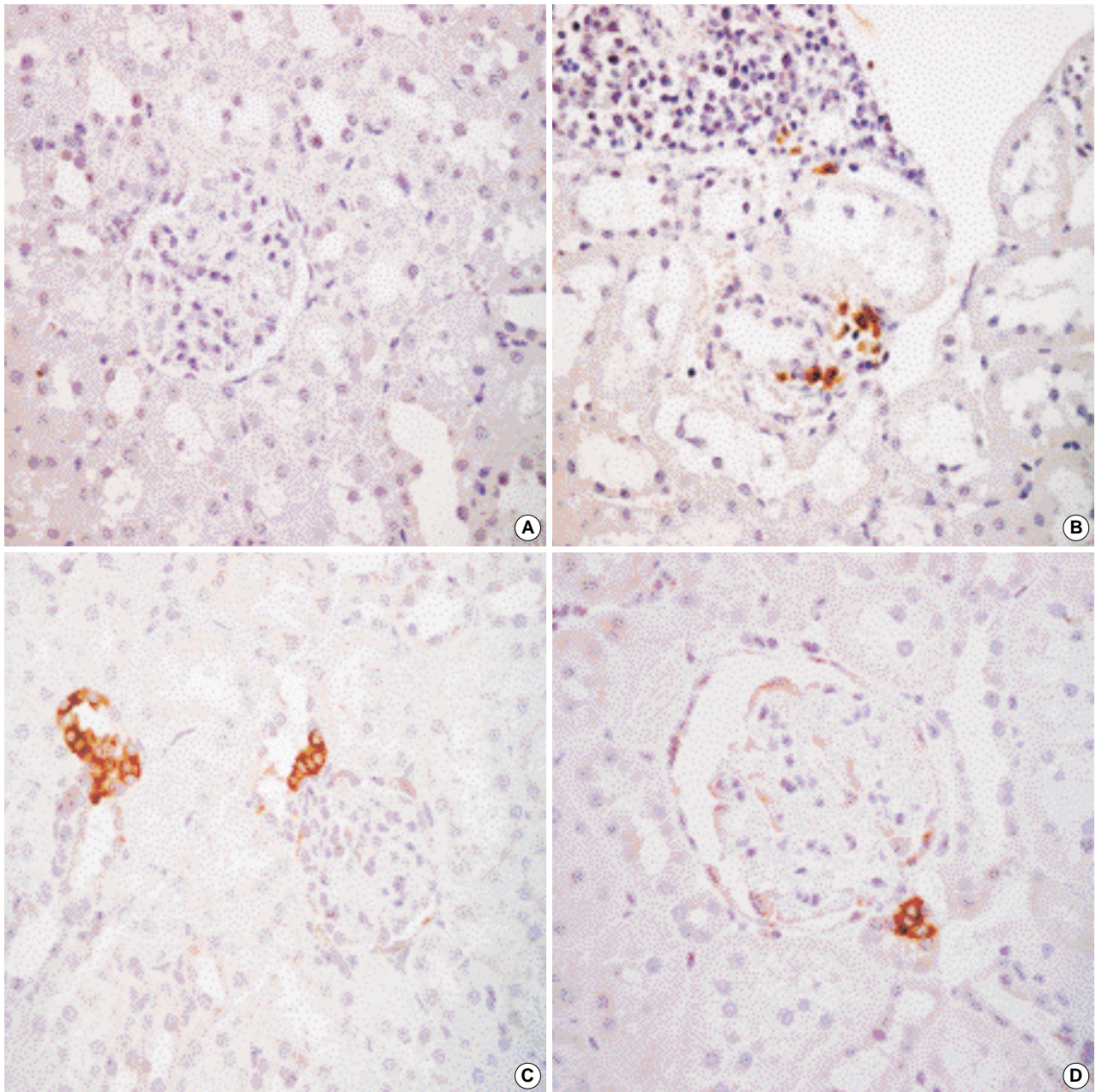


Fig. 2. NOS expression in kidney of old and young rats. (A) No iNOS expression is seen in the young rats, whereas (B) some immunoreactive cells for iNOS are seen in the interstitium of old rats. (C) Increased nNOS expression is seen in the macula densa of young rats than (D) that of old rats.

결 과

노화초기 쥐와 젊은 쥐에서 몸무게와 신장의 무게

노화 쥐의 몸무게는 626.3 ± 55.9 g으로 젊은 쥐의 296.4 ± 1.6 g에 비하여 현저히 컸으며($p=0.000$), 신장의 무게도 노화 쥐는 2.4 ± 0.5 g으로 젊은 쥐의 1.4 ± 0.2 g보다 컸다($p=0.000$). 그러나 몸무게당 신장의 무게 비는 노화 쥐가 0.4 ± 0.1 로 젊은 쥐의 0.5 ± 0.1 에 비해 유의하게 적었다($p=0.025$).

24시간 단백질, 혈청 크레아티닌치와 소변내 NO

혈청 크레아티닌치는 젊은 쥐에서 0.5 ± 0.04 mg/dL, 노화 쥐에서 1.0 ± 0.2 mg/dL로 노화 쥐에서 유의하게 증가하였다($p=0.000$). 24시간 단백질은 노화 쥐에서 31.2 ± 18.7 mg/dL, 젊은 쥐에서 18.2 ± 6.2 mg/dL로 노화 쥐에서 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다($p=0.061$). 소변내 NO는 노화 쥐에서 69.6 ± 32.4 μ M로 젊은 쥐의 66.5 ± 39.9 μ M와 차이를 보이지 않았다($p=0.867$).

노화초기 쥐와 젊은 쥐 신장의 조직 소견

젊은 쥐에서 사구체 전경화증과 국소 경화증은 관찰되지 않았다. 노화 쥐는 젊은 쥐보다 사구체의 크기가 컸으며, 전경화증이 $0.4 \pm 0.1\%$, 국소 경화증이 $3.5 \pm 6.9\%$ 관찰되었다. 젊은 쥐에서 사이질내 염증 세포 침윤은 관찰되지 않았고 노화 쥐에서는 10예 중 5예에서 부분적으로 경도의 염증 세포 침윤이 관찰되었다. 사이질의 섬유화는 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 관찰되지 않았다. 대식 세포 침윤을 보기 위해 ED-1에 대한 면역조직 화학염색을 시행한 결과 사구체당 젊은 쥐에서 0.6 ± 0.3 개, 노화 쥐에서는 0.4 ± 0.2 개의 양성세포가 관찰되었다($p=0.044$). 세뇨관-사이질에서는 젊은 쥐에서 ED-1 양성세포가 15.9 ± 5.9 개로, 노화 쥐의 25.9 ± 18.8 개보다 적었으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

노화초기 쥐와 젊은 쥐 신장의 세포증식능

PCNA 지수는 젊은 쥐와 노화 쥐의 사구체에서 각각 0.6 ± 0.4 개와 0.1 ± 0.1 개($p=0.005$), 세뇨관-사이질에서는 각각 19.2 ± 9.6 개와 10.2 ± 4.9 개로($p=0.019$), 노화 쥐에서 지수가 현저히 감소하였다. TUNEL 양성세포는 사구체에서는 관찰되지 않았고, 세뇨관에서는 젊은 쥐에서 0.9 ± 0.8 개, 노화 쥐에서 0.5 ± 0.4 개로 세포자멸사 정도에는 차이가 없었다($p=0.202$).

신장내 NOS 아형의 발현

eNOS는 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 사구체 또는 사이질 혈

관내 뚜렷한 염색 소견을 보이지 않았다. iNOS는 젊은 쥐와 노화 쥐 모두 사구체내에서는 발현되지 않았다. 그러나 세뇨관-사이질 염증세포에서 젊은 쥐의 경우는 발현되지 않았고, 노화 쥐는 0.3 ± 0.7 개 염색되어 노화 쥐에서 더 많이 염색되었다($p=0.188$). nNOS는 사구체에서는 젊은 쥐의 경우 사구체당 0.1 ± 0.2 개, 노화 쥐에서는 0.1 ± 0.1 개로 염색되는 세포 수가 비슷하였다. 그러나 밀집반 부위의 세뇨관에서는 젊은 쥐가 9.5 ± 3.6 개, 노화 쥐가 5.6 ± 1.6 개로 노화 쥐에서 유의하게 적었다($p=0.009$) (Fig. 2).

고 찰

노화에 따른 신장의 형태학적, 기능적 변화는 잘 알려져 있다. 사람의 경우는 50세 이후 나이가 증가함에 따라서 사구체 경화율이 증가하며, 사이질의 섬유화가 진행된다. SD계 백서는 생후 약 8주가 지나면 번식력이 생기고 12개월부터는 노화의 여러 변화가 시작되어 사람의 50대에 해당하며, 20개월이 지나면 약 50%가 사망한다.²¹⁻²⁵ 본 연구에서는 노화의 초기 단계를 할 수 있는 12개월령의 백서를 대상으로 신장의 변화와 NOS의 발현을 측정하였다. 신장의 크기와 관련하여 증식정도 및 세포자멸사를 알아보기 위해 PCNA 및 Apoptag^R을 이용한 세포자멸사를 측정하였다. 그 결과 PCNA 지수는 현저히 감소한 반면, 세포자멸사 정도에는 차이가 없어 노화에 따른 신장의 크기는 증식능의 감소가 더 큰 영향을 준다고 추정할 수 있었다. 또한 노화 쥐는 단백질 및 혈청 크레아티닌치가 젊은 쥐에 비하여 증가하였으며, 사구체 경화율과 신장 사이질내 염증세포 침윤도 증가하였다. 특히 ED1 양성인 대식세포가 노화 쥐의 신장 사이질에서 현저히 침윤하였다. 대식세포는 여러 사구체 신염과 세뇨관-사이질 신염에서 신 손상에 관여할 뿐 아니라 노화에도 관여하고 있다. 대식세포는 여러 가지 염증성 또는 섬유성 시토킨을 분비하여 신손상에 관여하며, iNOS도 생성한다. 따라서 사이질의 섬유화가 관찰되지 않더라도 침윤된 대식세포가 신장 손상에 관여할 것으로 추정할 수 있다.

노화된 신장의 조직 내 malonaldehyde 등 산화성 산물의 증가, 산화성 스트레스를 유발하는 후기 당화 산물(advanced glycosylation end-products)과 그 수용체(RAGE)의 상호 작용 증가⁶가 보고되었다. 본 연구에서는 산화성 손상에 관여할 것으로 추정되는 iNOS 발현이 증가될 것으로 추정하고 이를 면역조직화학법으로 검증하고자 하였다. 그러나 소변내 NO량의 변화는 관찰되지 않았으며, 조직내 iNOS와 eNOS의 변화도 관찰되지 않았다. 또한 대표적인 예를 각각 1예씩 선정하여 시행한 Western blot에서도 신장내 iNOS 단백질의 표현은 두 군 모두에서 미약하였다. 반면 nNOS는 노화 쥐에서 현저하게 감소하였다. nNOS는 신장내에서 주로 밀집반에 표현되며, nNOS를 갑자기 억제시키면 세뇨관사구체피드백(tubuloglomerular feedback: TGF) 반응을 증가시킴으로써 단기내 체내 체액 조절에 관여하는 것으로 알려

져 있다.²⁶ 따라서 노화의 초기에는 신장내 혈류 감소가 산화성 손상에 선행되는 것이 아닌가 추정된다. SHR 백서에서 nNOS 표현이 감소되어 있으며,²⁷ streptozotocin으로 유발된 백서의 당뇨병 초기에 eNOS 표현의 변화는 없는 반면 nNOS가 감소하여²⁸ 혈류와 nNOS가 관련되어 있음을 간접적으로 시사하고 있다. 최근 Erdelyi 등²⁹은 백서 신장에서 체질형 NOS가 노화됨에 따라 감소한다고 보고하였다. 특히 수컷 백서에서는 eNOS와 nNOS가 모두 감소하는 반면, 암컷에서는 그 변화가 경미하다고 하였다.

이상의 결과를 종합하면 본 실험에서 사용된 쥐의 노화가 심하게 진행되지 않아 신장의 기능 및 형태학적 병변이 경미하였을 것으로 추정된다. 그러나 노화가 진행됨에 따라 세포자멸사보다는 증식능이 현저히 감소되는 것으로 생각된다. NOS 아형에 관하여 신장 조직내 iNOS와 eNOS 간 역할 전환은 관찰되지 않았으나, 체질형 NOS인 nNOS의 감소에 대하여는 그 역할을 심도 깊게 연구해야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Kaplan C, Pasternack B, Shah H, Gallo G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am J Pathol* 1975; 80: 227-34.
- McLachlan MSF, Guthrie JC, Anderson CK, Fulker MJ. Vascular and glomerular changes in the aging kidney. *J Pathol* 1977; 121: 65-77.
- Lindeman RD, Tobin JD, Shock NW. Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 278-85.
- Rowe JW, Andres RA, Tobin JD, Norris AH, Shock NW. The effect of age on creatinine clearance in man: A cross-sectional and longitudinal study. *J Gerontol* 1976; 31: 155-63.
- Takazakura E, Sawabu N, Handa A, Takada A, Shinda A, Takeuchi J. Intrarenal vascular changes with age and disease. *Kidney Int* 1972; 2: 224-30.
- Reckelhoff JF, Kanji V, Racusen LC, *et al.* Vitamin E ameliorates enhanced renal lipid peroxidation and accumulation of F₂-isoprostanes in aging kidneys. *Am J Physiol* 1998; 274: R767-74.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-13.
- Ujiiie K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, Star RA. Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267: 296-302.
- Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1995; 268: 885-98.
- Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267: 748-57.
- Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the kidney. *Am J Physiol* 1997; 272: 561-78.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141: 2407-12.
- Heeringa P, van Goor H, Moshage H, *et al.* Expression of iNOS, eNOS, and peroxynitrite-modified proteins in experimental anti-myeloperoxidase associated crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53: 382-93.
- Uttenthal LO, Alonso D, Fernandez AP, *et al.* Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech* 1998; 43: 75-88.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thomson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11853-8.
- Furusu A, Miyazaki M, Abe K, *et al.* Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53: 1760-8.
- Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, Oyama TT, Shankland SJ, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease in aging: Evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 231-42.
- Reckelhoff JF, Hennington BS, Kanji V, *et al.* Chronic aminoguanidine attenuates renal dysfunction and injury in aging rats. *Am J Hypertens* 1999; 12: 492-8.
- Greenfield Z, Dey R, Baylis C. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) level in macula densa (MD) of old rat kidney [abstract]. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 329.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Couser WG, Stilmant MM. Mesangial lesions and focal glomerular sclerosis in the aging rat. *Lab Invest* 1975; 33: 491-501.
- Couser WG, Stilmant MM. The immunopathology of the aging rat kidney. *J Gerontol* 1976; 31: 13-22.
- Goldstein RS, Tarloff JB, Hook JB. Age-related nephropathy in laboratory rats. *FASEB J* 1988; 2: 2241-51.
- Sakemi T, Ohtsuka N, Tomiyosi Y, Morito F. Attenuating effect of castration on glomerular injury is age-dependent in unilaterally nephrectomized male Sprague-Dawley rats. *Nephron* 1997; 75: 342-9.
- Balyis C, Corman B. The aging kidney: insights from experimental studies. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 699-709.
- Ollerstam A, Persson EG. Macula densa neuronal nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 189-96.
- Kumar U, Shin Y, Wersinger C, Patel Y, Sidhu A. Diminished expres-

- sion of constitutive nitric oxide synthases in the kidney of spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 2003; 25: 271-82.
28. Keynan S, Hirshberg B, Levin-Iaina N, *et al.* Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 2000; 58: 740-7.
29. Erdely A, Greenfeld Z, Wagner L, Baylis C. Sexual dimorphism in the aging kidney: Effects on injury and nitric oxide system. *Kidney Int* 2003; 63: 1021-6.