

당뇨병성 신증을 유발한 백서 사구체에서 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)의 변화와 안지오텐신 전환효소 억제제 (ACEI) 및 안지오텐신 II 1형 수용체 (AT1) 차단제 (ARB)의 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실

최규현 · 노현진 · 김범석 · 강신욱 · 한대석 · 이호영

〈요 약〉

목 적 : 당뇨병성 신증을 유발한 동물 모델에서 iNOS 경로의 활성화를 검색하고 ACEI와 ARB의 효과를 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

방 법 : Sprague-Dawley rat에 당뇨를 유발한 후 12주에 쥐를 희생하여 사구체의 iNOS mRNA 및 단백 표현을 각각 역전사 중합효소 연쇄반응법 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)과 Western blot 분석법으로 조사하였다. iNOS의 충분한 유도를 위하여 희생 전 4시간에 lipopolysaccharide (LPS: 2 mg/kg) 혹은 vehicle을 복강 내 주사하였으며, ACEI나 ARB를 투여한 당뇨쥐에서는 모두 LPS를 투여하였다.

결 과 : LPS로 자극하지 않은 당뇨쥐에서 iNOS mRNA의 기저 표현은 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있었으며, 단백질 표현은 증가되는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. LPS로 자극한 경우 당뇨쥐의 iNOS mRNA 표현이 대조군의 약 2.34배, 단백질 표현이 약 1.86배로 통계적으로 유의하게 증가되었다. 이러한 iNOS의 증가 현상은 ACEI 및 ARB의 투여에 의하여 유의하게 억제되었다.

결 론 : 당뇨병성 신증에서 iNOS mRNA 및 단백질 표현이 증가됨을 관찰하였으며, AT1을 통한 안지오텐신 II (AII)의 작용이 이러한 iNOS의 증가를 매개하는 것으로 사료된다.

서 론

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주된 원인 질환일 뿐 아니라 당뇨병에 의한 가장 심각한 장기 합병증 중 하나이다. 2001년 대한신장학회에서 주관한 인산 기념 등록사업에 의하면 새로 진단 받은 말기 신부전증 환자의 약 41.5%가 당뇨병성 신증에서 기인하

여 말기 신부전증의 가장 많은 원인 질환으로 보고되고 있다¹⁾. 당뇨병성 신증의 병리 기전은 많은 연구에도 불구하고 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 고포도당혈증이 중요한 결정인자로 작용하는 것으로 생각되고 있다²⁾. 고포도당혈증에 의한 세포 내 포도당 농도의 증가는 다양한 경로를 경유하여 각종 cytokine, 성장인자, 혈관조절인자들의 변화를 유발하며, 이러한 변화의 복잡한 상호작용에 의하여 궁극적으로 당뇨병성 신증이 유발되는 것으로 알려져 있다.

당뇨병성 신증에 있어서의 NO의 변화는 보고자마다 차이가 있으며 대부분 constitutive NOS (cNOS)에 대한 연구 결과이고³⁻⁸⁾, iNOS에 대한 연구⁹⁻¹³⁾는 그리 많지 않다. 그러나, 당뇨병성 신증 환자 및 동물 모델에서도 TNF- α , IFN- γ 등을 포함한 cytokine

본 연구는 2000년도 대한신장학회 MSD연구비 (수혜자: 최규현)의 일부 보조로 진행되었음.

접수: 2003년 4월 11일, 승인: 2003년 6월 19일

책임저자: 노현진 서울시 용산구 한남동 657

순천향대학교 의과대학 내과학교실

Tel: 02)709-9491, Fax: 02)792-5812

E-mail: nohneph@hotmail.com

의 활성화가 나타나고¹⁴⁾ 당뇨병을 유발한 백서에서 초기에 대식 세포의 사구체 내 침윤이 관찰된다는 보고¹⁵⁾들에 근거하여 볼 때, iNOS 또한 매개 인자의 하나일 가능성이 제시되고 있다. 본 연구자 등은 최근에 백서 사구체 매산지음 세포에서 고포도당에 의하여 iNOS 경로에 의한 NO의 합성이 의의 있게 증가됨을 확인하였으며, 이러한 변화는 fibronectin의 합성과 상관성이 있음을 보고한 바 있다¹³⁾. 본 연구는 당뇨병성 신증을 유발한 동물 모델에서도 이와 같은 변화가 관찰되는지 알아보기 위한 연구이며, 아울러 허혈-재관류 동물 모델¹⁶⁾이나 Dahl salt-sensitive 고혈압 동물 모델¹⁷⁾에서 심근의 기능을 호전시키고 증가된 iNOS를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고된 ACE 억제제의 효과에 대하여 검색하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 조건

연세대학교 임상의학연구센터에서 분양 받은 250-300 gm의 수컷 Sprague-Dawley rat을 실험 동물로 이용하였으며, streptozotocin (STZ, 65 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 복강 내 주사하여 당뇨를 유발하였다. 대조군은 생리식염수만을 복강 내 주사하였다. STZ 주사 후 48시간에 혈당이 300 mg/dL 이상인 쥐만을 선택하여 당뇨군으로 설정하였으며, 당뇨군 쥐는 다시 ACEI (imidapril 2 mg/kg/day, 동아제약) 투여군과 ARB (L-158,809 1 mg/kg/day, MSD) 투여군, vehicle (증류수) 투여군의 세 군으로 무작위 분류되었고 약물은 기구를 이용하여 경구로 투여되었다. 실험 동물의 사료 및 음수 공급은 제한하지 않았으며, 당뇨 유발 후 12주에 쥐를 희생하였다. 희생 전 4시간에 iNOS의 충분한 유도를 위하여 LPS (2 mg/kg) 혹은 증류수를 복강 내 주사하였으며, ACEI나 ARB를 투여한 당뇨쥐에서는 모두 LPS를 투여하였다. 각 군의 쥐는 최소한 5마리 이상을 포함하였고, 희생된 쥐로부터 적출한 신장에서 Harper 등의 방법¹⁸⁾에 의하여 사구체를 분리하였다.

2. 실험 방법

1) 혈당 및 요단백 검사

각 군의 쥐는 매 2주 간격으로 꼬리 정맥으로부터 채혈한 혈액을 이용하여 혈당을 측정하였고, 매 4주

간격으로 대사 쥐장에 넣어 24시간 소변을 채집한 후 단백을 측정하였다. 혈당의 측정은 glucometer를 이용하였으며 요단백은 Bio-Rad assay를 이용하여 Bradford 방법으로 측정하였다.

2) 수축기 혈압 측정

매 4주 간격으로 tail plethysmography를 이용하여 수축기 혈압을 측정하였으며, 최소한 3번 이상씩을 측정하여 평균값을 이용하였다.

3) 총 RNA의 분리 및 RT-PCR

분리된 사구체에 100 μ L의 RNA STAT-60 시약 (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)을 첨가한 후 냉동, 동결 과정을 3회 반복하여 사구체를 균질화 하였다. 여기에 RNA STAT-60 시약 700 μ L를 새로 첨가하여 실온에서 5분간 방치하였다가 400 μ L의 chloroform을 첨가하여 30초 동안 세계 혼합한 후 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 400 μ L의 isopropanol을 이용, RNA를 침전시키고 4°C에서 12,000 \times g로 30분간 원심 분리하였다. 추출된 총 RNA를 70% ethanol로 세척하고 Speed Vac을 이용하여 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리된 탈이온수에 용해하여 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정, RNA 양을 정량하였다. 역전사는 10 μ mol/L random hexanucleotide primer, 1 mmol/L dNTP, 8 mmol/L MgCl₂, 30 mmol/L KCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 0.2 mmol/L dithiothreitol, 25 U RNase inhibitor, 40 U AMV reverse transcriptase를 사용하였다. 총 20 μ L의 혼합물을 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간 배양한 후 99°C에서 5분간 가열하여 불활성화 하였다. PCR 기기는 Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, New York, USA)를 이용하였다.

본 연구에 사용한 primer는 Genotech사에 의뢰하여 제작하였고 GAPDH와 iNOS primer의 각 염기 서열은 다음과 같다: GAPDH sense 5'-GACAAG-ATGGTGAAGGTCGG-3', anti-sense 5'-CATGG-ACTGTGG TCATGAAGC-3'; iNOS sense 5'-GGTGAAGCGGTGTTCTTTGC-3', anti-sense 5'-GGTGAGACAGTTTCTGGTTCG-3'. Inducible NOS와 GAPDH의 PCR 산물은 각각 389 bp, 538 bp로서 PCR이 끝난 후 전기영동상 DNA 분절의 크기를 확인하였다. Inducible NOS mRNA의 표현은

검체 내의 역전사 효율성의 차이를 보정하기 위하여 모든 검체의 iNOS PCR 산물의 밀도를 GAPDH 밀도로 보정하였고, 이를 위해 iNOS와 GAPDH 밀도의 비가 최고의 예민도를 보이는 cDNA의 양과 PCR의 횟수를 결정한 후 본 실험에 사용하였다. PCR은 cDNA, Taq polymerase (1U for GAPDH) 혹은 Taq-Gold polymerase (2.5 U for iNOS), 20 μ mol/L dNTP, sense와 anti-sense primer (20 pmol for GAPDH, 30 pmol for iNOS)와 1.5 mM의 MgCl₂를 함유한 용액을 이용하여 시행되었다. GAPDH와 iNOS PCR의 조건은 다음과 같다: GAPDH, 95°C에서 3분간 가열한 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 과정을 38회 반복하고 72°C에서 7분간 가열; iNOS, 95°C에서 9분간 가열한 후 94.5°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 2분의 과정을 45회 반복하고 72°C에서 7분간 가열하였다. 모든 PCR 산물은 2% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였으며, 자가방사기록은 CSC camera (Canon, Tokyo, Japan)를 이용하여 TINA 2.10e program으로 밀도를 측정하였다.

4) Western blot

분리된 사구체에 lysis buffer (2% SDS, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% (vol/vol) glycerol)를 첨가하여 세포 균질액을 만들고 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후, 상층액을 취하여 분석에 이용하였다. Bio-Rad assay 이용하여 Bradford 방법으로 단백질을 정량한 후 30 μ g의 단백질을 SDS와 β -mercaptoethanol이 포함된 sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분간 끓였다. 7.5% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 각각의 단백질을 분리하고 Hoeffer semidry blotting 기구 (Hoeffer Instruments, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 nitrocellulose 흡착지에 이전하였다. Inducible NOS에 대한 일차 항체 (mouse monoclonal anti-rat antibody; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)를 처리하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하고, 이차 항체 (horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG; Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Signal은 enhanced chemiluminescence 시약 (Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)을 이용하여 가시화하였다.

5) 통계 분석

모든 값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 각 군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 Fisher's test로 검정하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈당, 체중, 신장의 무게 및 혈압 변화

당뇨쥐는 실험 기간 동안 지속적으로 대조군에 비하여 높은 혈당을 유지하였으며, ACEI나 ARB의 투여는 혈당의 변화를 유발하지 않았다. 대조군 쥐에서 시간의 경과에 따라 현저한 체중의 증가를 보이는 반면, 당뇨쥐에서는 뚜렷한 체중의 변화가 관찰되지 않았고, ACEI나 ARB를 투여한 당뇨쥐에서도 비치료 당뇨쥐에 비하여 체중의 차이는 없었다. 희생 당시 측정된 체중에 대한 신장의 무게 비는 당뇨쥐에서 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있었고, 약물을 투여한 당뇨쥐에서 비치료 당뇨쥐에 비하여 유의한 차이는 없었다 (Table 1). 당뇨 유발 후 4주째부터 수축기 혈압이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나, 본 연구에서 사용한 용량의 ACEI나 ARB는 뚜렷한 수축기 혈압의 감소를 유발하지 않았다 (Table 2).

2. 24시간 소변의 단백질량 변화

당뇨 유발 4주째부터 당뇨쥐에서 대조군에 비하여 단백질이 유의하게 증가되었으며 이러한 차이는 12주째까지 지속되었다. ACEI를 투여한 당뇨쥐에서는 4주, 8주, 12주에 모두 비치료 당뇨쥐에 비하여 24시간 소변의 단백질이 유의하게 감소되었으며, ARB 치료군에서는 4주, 8주에 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 의의는 없었고, 12주째에 이르러 통계적으로 유의한 감소를 보였다 (Table 2).

3. 사구체 iNOS mRNA 및 단백질의 표현

LPS를 투여하지 않은 당뇨쥐에서 대조군에 비하여 iNOS mRNA의 표현이 증가되어 있었으며 (3.08 \times), 당뇨군과 대조군 모두 LPS를 투여함으로써 iNOS mRNA의 표현이 유의하게 증가되었다. LPS로 자극한 당뇨쥐는 대조군에 비하여 약 2.34배로 iNOS mRNA의 표현이 증가되었으며, 이러한 증가는 ACEI 및 ARB의 투여에 의하여 대조군 수준 (1.12 \times , 1.12

Table 1. Blood Glucose, Body Weight, and Kidney Weight/Body Weight in 4 Groups

Parameter	Control	DM	DM+I	DM+L
Blood glucose (mg/dL)				
Week 0	93.4±1.3	480.3±6.1*	487.3±7.8*	477.0±6.0*
Week 4	117.3±5.1	468.7±9.7*	462.0±13.1*	473.5±25.5*
Week 8	138.7±6.5	465.0±11.2*	463.5±18.3*	458.0±16.0*
Week 12	121.1±8.1	495.5±1.2*	498.0±2.9*	486.0±12.0*
Body weight (g)				
Week 0	252.9±4.7	261.1±4.1	269.8±4.7	277.0±3.0
Week 4	397.7±5.5	250.8±8.0*	285.8±17.1*	297.0±33.0*
Week 8	471.2±11.4	258.1±11.8*	264.6±26.8*	296.5±55.5*
Week 12	510.3±24.2	266.3±18.5*	258.8±34.0*	284.5±91.5*
Kidney weight/Body weight (1,000)				
Week 4	7.1±0.3	15.3±0.4*		
Week 8	6.2±0.2	15.2±0.8*		
Week 12	6.5±0.2	15.1±0.3*	16.8±2.0*	14.3±2.3*

Data are expressed as mean±SEM, I: imidapril, L: L-158,809, *p<0.01 vs. control
Week 0: 48 hours after STZ injection

Table 2. Systolic Blood Pressure and 24-hour Urinary Protein Excretion in 4 Groups

Parameter	Control	DM	DM+I	DM+L
SBP (mmHg)				
Week 0	113.5±3.0	115.5±5.6	113.5±5.7	108.6±11.1
Week 4	122.7±2.9	132.4±3.1*	130.1±11.1	132.5±23.8
Week 8	122.2±1.7	136.9±4.0*	136.6±3.4*	137.2±2.9
Week 12	131.5±4.9	148.1±5.4*	137.3±6.8	142.0±1.7
Urinary protein excretion (mg/d)				
Week 4	23.0±1.5	78.8±7.2*	45.4±1.9* [†]	66.3±6.0*
Week 8	23.9±1.2	73.8±7.2*	50.2±3.7* [†]	62.5±3.6*
Week 12	19.8±3.2	90.6±11.3*	59.0±2.8* [†]	61.6±6.6* [†]

Data are expressed as mean±SEM
I: imidapril, L: L-158,809, *p<0.05 vs. control, [†]p<0.05 vs. DM

×)으로 억제되었다 (Fig. 1).

LPS를 투여하지 않은 당뇨쥐와 대조군에서 iNOS 단백질의 표현은 유의한 차이를 보이지 않았으며 양군 모두 LPS의 투여에 의하여 iNOS 단백질 표현이 유의하게 증가되었다. LPS로 자극한 당뇨쥐는 대조군에 비하여 약 1.86배로 iNOS 단백질의 표현이 증가되었으며, 이러한 증가는 ACEI와 ARB에 의하여 대조군 수준 (0.77×, 0.94×)으로 억제되었다 (Fig. 2).

고 찰

당뇨병성 신증은 국내외적으로 말기 신부전증을 유

발하는 가장 중요한 원인 신장 질환으로서 고포도당 혈증에 의하여 발생 및 진행이 촉진되어지는 것으로 알려져 있으나, 이에 관여하는 인자들의 정확한 발병 기전에 대해서는 많은 가설이 존재하고 있는 실정이다. 다양한 매개 인자들 가운데 하나로 제시되고 있는 NO는 세포질 내에서 L-arginine으로부터 생성되는 유리 라디칼의 일종이며, 이 과정을 매개하는 NOS는 두 가지 constitutive isoform (endothelial, neuronal, 각각 eNOS, nNOS)과 inducible isoform으로 분류된다. 신장 내에서 eNOS는 사구체 모세혈관의 내피 세포 및 efferent, afferent arteriole과 intrarenal artery의 내피 세포, 세뇨관 상피 세포 등에서 표현되며,

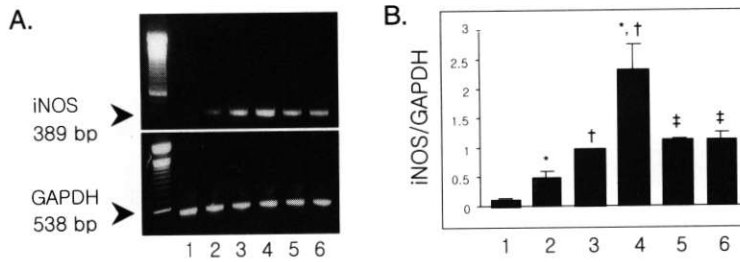


Fig. 1. (A) A representative RT-PCR at 12 weeks. (B) Values are the intensity of densitometric readings of iNOS mRNA corrected for GAPDH mRNA. Lane 1, control (C); lane 2, DM; lane 3, C+LPS; lane 4, DM+LPS; lane 5, DM+LPS+I; lane 6, DM+LPS+L. Values are expressed as a relative to that of C+LPS from four experiments. I: imidapril, L: L-158,809. * $p < 0.05$ vs. paired C; † $p < 0.05$ vs. corresponding values without LPS; ‡ $p < 0.05$ vs. DM+LPS.

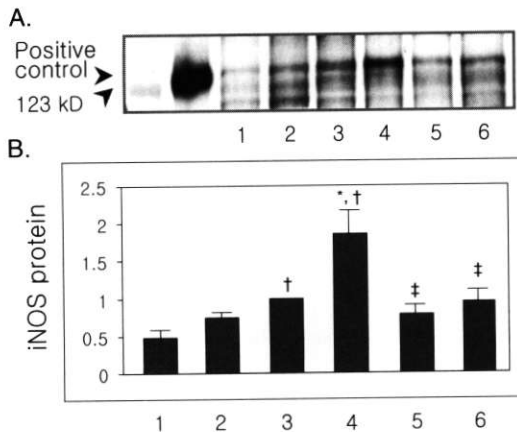


Fig. 2. (A) A representative Western blot at 12 weeks. (B) Values are the intensity of densitometric readings of iNOS protein. Lane 1, control (C); lane 2, DM; lane 3, C+LPS; lane 4, DM+LPS; lane 5, DM+LPS+I; lane 6, DM+LPS+L. Values are expressed as a relative to that of C+LPS from four experiments. I: imidapril, L: L-158,809. * $p < 0.05$ vs. C+LPS; † $p < 0.05$ vs. corresponding values without LPS; ‡ $p < 0.05$ vs. DM+LPS.

nNOS는 macula densa와 사구체 상피 세포 및 세뇨관 상피 세포 등에서, iNOS는 사구체 메산지움 세포 및 medullary thick ascending limb of Henle's loop (MTAL)와 근위 세뇨관을 비롯한 세뇨관 상피 세포에서 표현되는 것으로 보고되어 있다¹⁹. 정상적으로 NO는 사구체의 혈액역학적 조절 및 여과 작용에 관여하며 세뇨관에서의 sodium 배설을 조절하는 생리적 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으나²⁰, 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^{21, 22}. 이와 같은 다량의 NO에 의한 신 독성 기전은 면역 매개성 사구체신염²³이나 폐쇄성 요로 질환²⁴ 등의 다양한 신장 질환에서 보고되어 있으며, 고혈압 동물 모델 및 인체의 사구체 질환 등에서 보고된 바에 의하면 생성된 NO의 효소적 근원에 따라서 신장에 대한 작용이 서로 상반될 수 있음이 제시되어 있다. 즉, eNOS에 의하여 소량으로 생성된 NO는 위에 언급한 바와 같은 정상 생리 작용에 관여함으로써 신장 손상에 대한 보호 작용을 하는 것으로 생각되나, 병적인 조건하에서 다양한 cytokine에 의하여 iNOS 경로가 활성화됨으로써 다량의 NO가 생성되는 경우에는 오히려 신장의 손상을 유발할 수 있어 NOS의 "role switch"가 가능한 것으로 제시되기도 하였다²⁵.

당뇨병성 신증에 있어서 NO의 변화와 그 역할에 대한 연구 결과들은 많은 경우에 cNOS를 대상으로 하였고 당뇨의 유발 기간이나 실험 조건들에 따라 상이한 결과를 보이고 있으나, 대체로 초기에 관찰되는 사구체의 과여과에 있어서 NO의 합성 증가가 관여하고 시간의 경과에 따라 NO의 안정성이 저하됨으로써 그 작용이 감소되는 것으로 제시되고 있다³⁻⁸). 당뇨병성 신증에 있어서의 iNOS의 변화에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않으며, 실제로 연구 결과 또한 일관된 경향을 보이지 않고 있다. Schwartz 등¹¹은 4

주된 당뇨쥐에서 iNOS mRNA의 표현이 대조군에 비하여 변화되지 않으며 사구체의 과여과 현상과도 관련성이 없는 것으로 보고한 반면, Sugimoto 등¹²⁾은 당뇨 유발 후 52주에 사구체의 iNOS 표현이 의의 있게 증가되어 있음을 보고하였고, 후기당화산물과 cytokine-iNOS의 활성화가 시간적 연속성을 가질 것으로 제시한 바 있다. 당뇨 유발 후 12주에 평가한 본 연구는 Schwartz 등의 보고와는 다른 결과이나, 당뇨 유발 기간이 길었던 Sugimoto 등의 결과와는 일치하는 소견이며, 본 연구자들이 이미 보고한 in vitro 실험 결과와도 일치하는 결과이다.¹³⁾

당뇨병성 신증의 발생과 진행에 국소적인 레닌 안지오텐신계의 활성화가 중요한 역할을 하는 것은 이미 잘 알려져 있다.²⁶⁾ AII는 신장의 혈관을 수축시키고 사구체 혈류와 여과를 조절하는 등의 혈역동학적 작용을 하는 이외에도 성장인자로서의 기능이나 pro-fibrogenic, proinflammatory mediator로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ACEI나 ARB의 치료를 통하여 동물 혹은 인체에서 당뇨병성 신증의 진행이 억제되는 것이 보고되어 있고 이러한 작용은 혈역동학적 작용과는 무관한 독립적인 작용으로 인정되고 있다. AII와 NO는 신장의 혈역동학적 측면에서 서로 밀접한 상호 작용을 할 것으로 제시되고 있지만^{27, 28)}, AII가 inducible NO의 생성에 미치는 영향에 관하여는 서로 상반되는 결과들이 보고되고 있다. Wolf 등²⁹⁾과 Kihara 등³⁰⁾은 각각 생쥐의 근위 세뇨관 상피 세포와 백서 메산지움 세포에서 AII가 inducible NO의 생성을 억제하는 것으로 보고한 반면, Ikeda 등³¹⁾과 Yasuda 등³²⁾은 백서와 토끼의 심근 세포를 이용하여 AII가 inducible NO의 생성을 증가시키는 것으로 보고하였다. 최근에 Schwobel 등³³⁾은 백서 사구체 메산지움 세포에서 AII가 작용하는 수용체의 아형에 따라 iNOS 경로에 미치는 영향이 상반되는 것으로 보고하여 이제까지의 상이한 결과를 설명할 수 있는 단서를 제공하였다. 즉, AT1과 작용한 AII는 iNOS를 활성화시키는 반면, AT2와 작용한 AII는 iNOS를 오히려 감소시키는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 AT1 차단제를 투여함으로써 iNOS mRNA 및 단백질의 표현이 비치료 당뇨군에 비하여 의의 있게 감소되는 결과를 얻었고 ACEI의 투여에 의해서도 유사한 수준의 억제 효과를 얻어 AT1을 통한 AII의 작용이 iNOS의 향진을 매개하는 것을 알 수 있었다. 본 연

구에서는 AII가 iNOS의 향진을 매개하는 기전은 밝히지 못하였으나, 다음과 같은 가설을 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 즉, AII가 NADH/NADPH oxidase를 활성화시킴으로서 superoxide 라디칼의 생성을 촉진, 산화성 스트레스를 유발할 수 있는 것으로 보고된 바 있고^{34, 35)}, 이러한 산화성 스트레스는 nuclear factor- κ B와 같은 전사 인자를 활성화하는 것으로 알려져 있으므로³⁶⁾ 이러한 일련의 변화가 iNOS의 향진을 매개하는 기전이 될 수 있을 것으로 추정되며, 앞으로 이에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로, 당뇨병성 신증을 유발한 백서 사구체에서 iNOS의 표현이 증가됨을 확인하였고, AT1을 통한 AII의 작용이 이러한 iNOS의 증가를 매개하는 것으로 사료된다.

= **Abstract** =

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) is Increased in Diabetic Rat Glomeruli : Role of Angiotensin II (AII)

Kyu Hun Choi, M.D., Hyunjin Noh, M.D.
Bum Seok Kim, M.D., Shin Wook Kang, M.D.
Dae Suk Han, M.D. and Ho Yung Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Yonsei University College of Medicine,
Seoul, Korea*

Background : This study was designed to examine whether iNOS pathway is pathologically altered in experimental diabetic nephropathy and whether therapy with ACE inhibitor (imidapril: I) or angiotensin II type 1 receptor (AT1) blocker (L-158,809: L) ameliorates these changes.

Methods : Male SD rats were injected with diluent (control: C) or streptozotocin. Diabetic (D) rats were then randomized to receive vehicle, I (2 mg/kg/d) or L (1 mg/kg/d) by gavage. At the end of the 12-week treatment, rats underwent either a 4 hour placebo or an intraperitoneal LPS (2 mg/kg) challenge. Inducible NOS mRNA and protein were measured by RT-PCR and Western blot in isolated glomeruli.

Results : Systolic blood pressure and urinary protein excretion increased significantly in D rats compared with C. The basal expression of iNOS mRNA was increased in D rats compared with that of C, whereas there was no significant difference in the level of protein. Upon LPS stimulation, the iNOS

mRNA and protein expression was significantly elevated in D rats. In D rats, this up-regulation of LPS-stimulated iNOS expression was equally ameliorated by both I and L in mRNA and protein levels.

Conclusion : LPS-stimulated glomerular iNOS expression was enhanced in diabetic nephropathy, and the activation of angiotensin II may play a role in this enhancement. (**Korean J Nephrol 2003;22 (4):366-373**)

Key Words : Diabetic nephropathy, Inducible nitric oxide synthase, Angiotensin II

참 고 문 헌

- 1) 대한신장학회 등록위원회 : 우리나라 신대체요법의 현황. *대한신장학회지* 21(suppl 2):S189-S203, 2002
- 2) Diabetes Control and Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993
- 3) Bank N, Aynedjian HS : Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 43:1306-1312, 1993
- 4) Tolins JP, Shultz PJ, Raij L, Brown DM, Mauer SM : Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats : Role of NO. *Am J Physiol* 265:F886-895, 1993
- 5) Wang YX, Brooks DP, Edwards RM : Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 264:R952-956, 1993
- 6) Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR : Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats : Evidence for protein kinase C mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest* 93:311-320, 1994
- 7) Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR : Impaired nitric oxide release by glomeruli from diabetic rats. *Metabolism* 44:695-698, 1995
- 8) Craven PA, DeRubertis FR, Melhem M : Nitric oxide in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 52: S46-53, 1997
- 9) Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels : Possible mediation via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207:80-88, 1995
- 10) Trachtman H, Futterweit S, Crimmins DL : High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 8: 1276-1282, 1997
- 11) Schwartz D, Schwartz IF, Blantz RC : An analysis of renal nitric oxide contribution to hyperfiltration in diabetic rats. *J Lab Clin Med* 137: 107-114, 2001
- 12) Sugimoto H, Shikata K, Wada J, Horiuchi S, Makino H : Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy : aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* 42:878-886, 1999
- 13) Noh H, Ha H, Yu MR, Kang SW, Choi KH, Han DS, Lee HY : High glucose increases inducible NO production in cultured rat mesangial cells. *Nephron* 90:78-85, 2002
- 14) Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H : mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 42:450-456, 1993
- 15) Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J, Couser WG, Seidel K : Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 47:935-944, 1995
- 16) Mehta JL, Chen H, Li D, Phillips MI : Modulation of myocardial SOD and iNOS during ischemia-reperfusion by antisense directed at ACE mRNA. *J Mol Cell Cardiol* 32:2259-2268, 2000
- 17) Kobayashi N, Higashi T, Hara K, Shirataki H, Matsuoka H : Effects of imidapril on NOS expression and myocardial remodelling in failing heart of salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 44:518-526, 1999
- 18) Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ : Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 26:875-880, 1984
- 19) Kone BC : Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol* 19:230-241, 1999
- 20) Romero JC, Strick DM : Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:114-121, 1993
- 21) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.

- Proc Natl Acad Sci USA* **87**:1620-1624, 1990
- 22) Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL: Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:6770-6774, 1996
- 23) Heeringa P, van Goor H, Moshage H, Klok PA, Huitema MG, de Jager A, Schep AJ, Kallenberg CGM: Expression of iNOS, eNOS, and peroxynitrite-modified proteins in experimental anti-myeloperoxidase associated crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* **53**:382-393, 1998
- 24) Moridaira K, Yanagisawa H, Nodera M, Tamura J, Tsuchiya J, Naruse T, Wada O: Enhanced expression of vsmNOS mRNA in glomeruli from rats with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* **57**:1502-1511, 2000
- 25) Bennai F, Morsing P, Paliege A, Ketteler M, Mayer B, Tapp R, Bachmann S: Normalizing the expression of nitric oxide synthase by low dose ATI receptor antagonism parallels improved vascular morphology in hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* **10**(Suppl 11):S104-115, 1999
- 26) Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R: Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **58**(Suppl 77):S93-98, 2000
- 27) Garcia GE, Brown MR, Wead LM, Braun S, Gabbai FB: Effect of reduction of nitric oxide on plasma and kidney tissue angiotensin II levels. *Am J Hypertens* **10**:1103-1108, 1997
- 28) Madrid MI, Garcia-Salom M, Tornel J, de Gasparo M, Fenoy FJ: Effect of interactions between nitric oxide and angiotensin II on pressure diuresis and natriuresis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **273**:R1676-1682, 1997
- 29) Wolf G, Ziyadeh FN, Schroeder R, Stahl RA: Angiotensin II inhibits inducible nitric oxide synthase in tubular MCT cells by a posttranscriptional mechanism. *J Am Soc Nephrol* **8**:551-557, 1997
- 30) Kihara M, Yabana M, Toya Y, Kobayashi S, Fujita T, Iwamoto T, Ishigami T, Umemura S: Angiotensin II inhibits interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* **55**:1277-1283, 1999
- 31) Ikeda U, Maeda Y, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K: Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Circulation* **92**:2683-2689, 1995
- 32) Yasuda S, Lew WY: Angiotensin II exacerbates lipopolysaccharide-induced contractile depression in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **276**:H1442-1449, 1999
- 33) Schwobel J, Fischer T, Lanz B, Mohaupt M: Angiotensin II receptor subtypes determine induced NO production in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**:F1092-1100, 2000
- 34) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**:1141-1148, 1994
- 35) Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK: Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* **97**:1916-1923, 1996
- 36) Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ: Oxidative stress induces NF- κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **199**:1518-1524, 1994