

일측 신절제가 노화 쥐의
신손상에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

권 계 원

일측 신절제가 노화 쥐의
신손상에 미치는 영향

지도교수 정 현 주

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
권 계 원

권계원의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

이 논문을 위해 처음 동물실험을 하면서 많은 경험을 한 것이 가장 큰 성과였다고 생각합니다.

먼저 논문을 무사히 완성할 수 있도록 세심히 지도해주신 정현주 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 많은 관심으로 지켜봐 주셨던 김유선, 최규현, 진소영, 박영년 자문위원님들께 감사 드립니다. 언제나 배려를 아끼지 않으셨던 순천향의대 고은석 교수님께 깊은 감사를 드립니다. Western blot과 소변의 NO 측정에 도움을 주셨던 강신욱 교수님과 같이 실험을 해주셨던 강진구 선생님, 허종호 선생님께 감사 드립니다. 통계를 도와주셨던 순천향의대 안현철 교수님께 감사 드립니다. 실험에 관해 조언을 해주셨던 양우익 교수님과 조남훈 교수님께도 감사 드립니다.

결에서 늘 보살피 주시는 사랑하는 부모님과 가족들에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씬

차례

| | |
|--|----|
| 그림 및 표 차례 | |
| 국문 요약 | 1 |
| I. 서론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 6 |
| 1. 재료 | 6 |
| 가. 실험 재료 | 6 |
| 나. 실험 일정 | 6 |
| 2. 방법 | 6 |
| 가. 혈중 크레아티닌치, 24시간 단백뇨와 몸무게 및 신장의 무게 측정 | 6 |
| 나. 조직학적 검사 | 7 |
| 다. 소변 내 NO 측정 | 7 |
| 라. 면역조직화학염색 | 8 |
| 마. TUNEL assay | 8 |
| 바. Western blot (iNOS) | 9 |
| 사. 통계 처리 | 10 |
| III. 결과 | 11 |
| 1. 노화 쥐와 젊은 쥐에서 몸무게와 신장의 무게 비교 | 11 |
| 2. 혈청 크레아티닌치, 24시간 단백뇨와 소변내 NO 비교 | 12 |
| 3. 노화 쥐와 젊은 쥐 신장의 조직학적 소견 | 12 |
| 4. 세포증식능과 세포고사의 비교 | 14 |
| 5. 대식세포 침윤과 iNOS 발현의 비교 | 16 |
| 6. iNOS 단백질에 대한 Western blot 결과 | 18 |
| IV. 고찰 | 20 |
| V. 결론 | 24 |
| 참고 문헌 | 26 |
| 영문 요약 | 29 |

그림 차례

Fig. 1. KW/BW of young and old rats after uninephrectomy 11

Fig. 2. The serum creatinine, 24hr urinary protein, and urinary NO in young and old rats after uninephrectomy 13

Fig. 3. PCNA and TUNEL staining of kidney of old rats 3 weeks after uninephrectomy 15

Fig. 4. ED-1 and iNOS staining in kidney of old rats 5 weeks after uninephrectomy 17

Fig. 5. A representative iNOS protein expression in kidney of old rats 19

표 차례

Table 1. Renal histology of young and old rats after uninephrectomy 14

Table 2. The number of PCNA and TUNEL positive cells in young and old rats after uninephrectomy . . . 16

Table 3. The number of ED-1 and iNOS positive cells in young and old rats after uninephrectomy 18

국문요약

일측 신절제가 노화 쥐의 신손상에 미치는 영향

신장은 노화됨에 따라 여러 가지 기능적, 구조적 변화가 일어난다. 최근 노화 신장을 신장이식 수술에 이용하는 경우가 늘어나고 있지만 신절제에 대한 연구는 증식능이 활발한 젊은 쥐에서만 이루어져 있다.

본 연구에서는 노화 쥐에서 일측 신절제가 신손상에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 실험은 Sprague-Dawley (SD)계 웅성 쥐를 이용하였는데 12개월 된 노화 쥐와 6~8주된 젊은 쥐를 각각 24마리와 18마리씩 준비하여 몸무게, 혈청 크레아티닌치, 24시간 단백뇨, 소변내 nitric oxide (NO) 수치를 쟀 후 일측 신절제를 시행하였다. 이후 이들을 무작위로 3 그룹으로 나누어 각각 1, 3, 5주 후에 도살하였다. 떼어낸 신장은 무게를 쟀 후 조직학적 검사를 시행하여 사구체 경화증, 간질의 염증세포 침윤과 간질의 섬유화 정도를 평가하였으며 ED-1, inducible NO synthase (iNOS), proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 대한 면역조직화학염색 및 TUNEL assay를 시행하여 세포 침윤, 증식 및 고사를 평가하였다. 또한 신조직 일부는 iNOS 단백질에 대한 Western blot을 시행하여 조직소견과 비교하였다.

노화 쥐는 일측 신절제 전 젊은 쥐보다 혈청 크레아티닌치가 높았으나 24시간 단백뇨나 소변 NO 배설량에는 차이가 없었다. 일측 신절제 후 노화 쥐의 소변 NO 배설량은 젊은 쥐보다 유의 있게 증가하였으나, 혈청 크레아티닌치 및 24시간 뇨단백 배설량은 증가하지 않았다. 노화 쥐의 신장은 젊은 쥐의 신장에 비해 사구체 경화증과 간질의 염증세포 침윤 정도가 높았으나 일측 신절제에 의한 현저한 변화는 일어나지 않았다. 세포증식능

은 사구체 및 세뇨관 모두에서 노화 쥐보다 젊은 쥐에서 높았다. 젊은 쥐와 노화 쥐의 PCNA 발현은 일측 신절제 1주 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 세뇨관-간질에서 증가하였다. 세뇨관-간질에서 세포고사는 노화 쥐에서는 일측 신절제 3주 후부터, 젊은 쥐에서는 1주 후부터 지속적으로 의의 있게 증가하였다. 노화 쥐에서 대식세포의 침윤은 세뇨관-간질에서 젊은 쥐보다 많았고 일측 신절제 후에는 노화 쥐와 젊은 쥐 모두에서 대식세포 침윤이 증가하였으나 젊은 쥐에서만 통계적 의의를 보였다. 일측 신절제 전 신장 조직 내 iNOS 염색은 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 드물게 관찰되었는데 일측 신절제 후에 세뇨관-간질에서 iNOS 염색이 젊은 쥐에서 의의있게 증가하였고 노화 쥐에서는 증가하는 경향을 보였다. 또한 노화 쥐에서 iNOS 단백 발현은 일측 신절제 3주, 5주 후에 증가되었다.

이상의 결과로 노화 쥐에서 일측 신절제는 대식세포 침윤 및 이에 의한 iNOS 발현과 NO 생성 증가를 유발하였으나 그 정도가 미약하여 신장의 구조적, 기능적 변화에 큰 영향을 미치지 않음을 알았다. 일측 신절제는 초기에는 세포증식과 세포고사가 같이 증가하여 전체 세포수의 균형을 유지하나, 점차 세포고사가 증가하여 세포수가 감소할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 일측 신절제, 노화 신장, 세포 증식능, 세포 고사, iNOS

일측 신절제가 노화 쥐의 신손상에 미치는 영향

<지도교수 정현주>

연세대학교 대학원 의학과

권 계 원

I. 서론

사회 인구가 고령화되면서 노화에 대한 관심이 높아지고 있다. 신장에서도 노화시의 변화에 대한 연구가 증가하고 있으며¹⁻⁸ 노화 신장을 신장이식 수술에 이용하는 경우도 늘어나고 있다. 신장은 노화되면서 혈액학적 및 기능적 변화를 겪게되어, 신피질에 도달하는 혈액의 양은 줄어들고 상대적으로 수질의 혈액량은 증가하게 된다. 사구체 여과량은 출생시 39ml/min이고 2세에 성인 수준 (140ml/min)에 도달하여 약 30세까지 유지되다가 그 다음부터 10년에 8ml/min씩 하락한다⁸. 또한 세뇨관에서는 염분 조절능과 체액의 농축 또는 희석을 조절하는 기능이 저하되고 단백뇨 및 혈청 크레아티닌치가 증가하게 된다. 노화 신장에서는 이런 기능적 변화와 함께 구조적인 변화를 수반하는데 육안적으로 신장의 무게가 출생시 50g 이었다가 30대에 400g까지 증가되며 그 이후로는 무게가 감소되어 80대에는 300g 정도가 되며 신피질은 위축성 변화를 보인다³. 신피질내 혈액량의 감소로 사구체의 경화율이 증가하고 경화성 변화를 보이지 않는 사구체는 상대적으로 커지며 메산지움의 확장되고 기저막의 두께는 두꺼워진다. 또한 세뇨관에서는 세뇨관 상피세포의 소실 및 세뇨관 위축등이 나타나며 간질의 섬유화가 증가한다. 이러한 노화 신장의 기능적, 구조적 변화는 성별,

유전적 배경외에도 비만, 고단백/고지방 식이등 환경적 요인에 의해 많은 영향을 받는다^{1,6,9}. 노화 신장의 조직학적 변화는 세포고사 (apoptosis)와 세포증식능의 불균형, 정상 또는 비정상적인 세포외 기질의 생성 증가와 분해력 감소등에 영향을 받을 것으로 생각된다⁵. 한편 급격히 신실질이 감소되면 잔여신장은 보상적으로 비대되며 과여과/과관류 현상을 보이고 단백뇨가 증가하게 된다. 일측 신절제를 시행하면 잔여신장의 사구체가 비후되며 세포고사가 감소되고 세포증식능이 증가한다고 보고되었다¹⁰⁻¹⁷. 그러나 신절제에 대한 연구는 대부분 증식능이 활발한 젊은 쥐에서 이루어져 있으며 신장기능이 감소되어있는 노화 쥐에서 신절제가 젊은 쥐에 비해 어떠한 기능적 및 형태학적 변화를 보일 것인가에 대한 연구는 이루어져 있지 않다. 노화 신장의 손상을 매개하는 인자들은 아직 정확히 규명되어 있지 않으나 다양한 성장인자, 사이토카인, vasoactive peptides, 지질 매개체등이 관여 할 것으로 생각된다⁵. Nitric oxide(NO)는 L-arginine으로부터 생성되는 유리라디칼의 일종으로, 사구체의 혈액동학적 조절 및 혈관을 이완시키는 기능을 가지고 있다. NO 형성의 co-factor로 작용하는 NO synthase (NOS)에는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)와 inducible NOS (iNOS)가 있다. 신장에서 nNOS는 사구체 근접부장치 (juxtaglomerular apparatus)에서 높은 발현을 보이고, eNOS는 혈관 내피 세포에서 발현되어 긴장성 혈관확장을 유발하고 혈소판의 응집과 부착을 막는 중요한 역할을 하며, iNOS는 대식세포를 비롯해 메산지움세포, 소동맥, 수질의 집합관세포등 다양한 세포들에서 발현된다¹⁸. NOS의 변화가 노화 신손상과 관련 있다는 근거로서 Reckelhoff 등은 노화 신장 조직 내 iNOS단백 표현이 증가되어 있다고 보고하였으며¹⁹, Thomas 등은 노화 신장의 세뇨관 주위 모세혈관에서 eNOS 염색이 감소되어 있다고 보고하였다⁸. 또한 Valdivielso 등은 젊은 쥐에서 일측 신절제 후 iNOS가 사구체에

서 NO 합성을 증가시켜 혈관 저항을 감소시킨다고 하였으나²⁰, 노화 쥐에서 신절제가 iNOS 표현에 어떤 변화를 가져올 것인가는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 노화 신장에서 일측 신절제가 신손상에 미치는 영향을 알아보고자 일측 신절제 후 시간 경과에 따른 형태학적 변화와 이와 관련된 세포증식 및 소멸 정도를 비교하였으며, 신손상의 매개체로서 iNOS 발현의 변화에 대해 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 실험동물

표준 식이를 투여한 6~8주된 Sprague-Dawley (SD)계 웅성 쥐 18마리와 12개월된 SD계 웅성 쥐 24마리를 이용하였다.

나. 실험일정

준비된 모든 웅성 쥐에 일측 신절제를 시행하고 다시 표준 식이를 시행하다가 6~8주된 젊은 쥐는 각각 6마리씩, 12개월 된 노화 쥐는 8마리씩 나누어 1, 3, 5주 후에 차례로 도살하였다. 또한 6~8 주된 젊은 쥐와 12개월된 노화 쥐를 각각 3마리씩 더 준비하여 sham operation을 시행하였고 5주 후에 도살하였다.

2. 방법

가. 혈중 크레아티닌치, 24시간 단백뇨와 몸무게 및 신장의 무게 측정

일측 신절제 시행 하루 전 대사장 (metabolic cage)을 이용하여 24시간 소변을 받아 24시간 단백뇨를 측정하고 소변 내 NO를 측정하기 위해 남은 소변을 -80°C deep freezer에 보관하였다. 또한 혈액 1cc를 채취하여 혈청 크레아티닌 수치를 재고 백서의 몸무게를 잴다. 일측 신절제로 떼어낸 신장을 대조군으로 이용하였는데, 신장의 무게를 재고 각각 표시하여 반은 포르말린에 고정하고 반은 -80°C deep freezer에 보관하였다가 iNOS에 대한 Western blot에 이용하였다. 일측 신절제 1, 3, 5주 후에 도살할 때 마

찬가지로 도살 하루 전 24시간 소변을 받고 혈액 1cc를 채취하였고 몸무게를 잰다. 도살 후 남은 한쪽 신장을 떼어내어 신장의 무게를 재고 각각 표시하여 반은 포르말린에 고정하고 반은 -80°C deep freezer에 보관하였다. sham operation을 시행한 쥐들도 위와 같은 방법으로 실험하였다.

나. 조직학적 검사

일반적인 조직검사로 파라핀으로 포매된 검체를 $2\mu\text{m}$ 두께로 절편하여 periodic acid-Schiff (PAS)염색을 시행하였다. 각각의 증례에서 100개의 사구체를 검색하여 전경화증과 국소 경화증을 보이는 사구체의 개수를 세었다. 간질의 염증세포 침윤과 섬유화의 정도를 0-3으로 점수를 매겼는데 신피질내 간질의 염증세포 침윤이나 섬유화가 없는 경우를 0, 25% 미만에서 관찰될 때 1, 25-50%에서 관찰될 때 2, 50% 이상에서 관찰 될 때를 3 점으로 하였다.

다. 소변내 NO 측정

-80°C 에 보관되어 있는 24시간 소변을 녹여서 microcon (YM-10, Amicon)으로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 소변을 각각 $50\mu\text{l}$ 씩 취하여 NADPH와 nitrate reductase를 혼합, 실온에서 1시간 동안 반응시켜 nitrite를 nitrate로 환원시켰다. 용액 내 남아있는 NADPH를 glutamic dehydrogenase를 이용하여 제거하고 Griess assay를 시행하였다. Griess solution (6.5 mol/L HCL, 37.5 mmol/L sulfanilic acid, 12.5 mmol/L naphthyl-ethylene diamine dihydrochloride)과 반응시킨 후 4°C 10000 rpm에서 10분간 원심 분리하고, 상층액의 흡광도를 540nm에서 측정하였다. nitrate standard solution으로 Griess assay를 시행하여 standard curve로

사용하였으며, 이를 이용하여 검체 내에 존재하는 NO의 농도를 계산하였다.

라. 면역조직화학염색

파라핀으로 포매된 조직을 4 μ m 두께로 연속 절편하여 poly-L-lysine-coated 슬라이드에 부착하여 50⁰C에서 한시간 건조시켰다. Xylene에서 파라핀을 제거하고 에틸 알콜에서 단계적으로 함수한 후, 300ml methanol과 10ml hydrogen peroxide로 20분간 전처리하여 내인성 과산화 효소를 억제하였다. 수세 후 citrate buffer에 담그어 microwave에 10분간 가열하고 식힌 후 TRIS buffer (pH 7.6)에 10분간 처리하여 잔여 혈청을 제거하였다. PCNA (Novocastra Lab Ltd, Benton Lane, UK)와 ED-1 (Serotec, Indianapolis, IN)항체는 각각 1:50배와 1:100배로 희석하고 iNOS (Affinity Bioreagent, Golden, CO, USA)항체는 1:1000배로 희석하여 4⁰C 냉장고에서 하루동안 반응 시켰다. PBS buffer로 세척 후 Streptavidin-biotin-peroxidase complex technique (LSABR 2 kit peroxidase, DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 이용하였으며 3,3-diaminobenzidine으로 발색하였다. 각 예에서 30개의 사구체에서 갈색으로 염색된 세포수를 세어 사구체 하나당 양성 세포의 평균을 구하였고, 세뇨관-간질은 $\times 200$ 배에서 0.25 mm² grids로 30개 시야를 관찰하여 갈색으로 염색된 세포들을 모두 세었다.

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

세포고사 정도를 알아보기 위하여 시행한 TUNEL assay는 Apoptag peroxidase in situ apoptosis detection kits (Cat #S7100, Intergen, NY,

USA)를 이용하였다. 파라핀으로 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절편하여 poly-L-lysine-coated 슬라이드에 부착하여 50 $^{\circ}$ C에서 한시간 건조시켰다. 탈파라핀과 흡수과정을 거친 후 proteinase K를 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리한 후 증류수로 수세하였다. 3% H₂O₂ 용액에 5분 정도 반응시킨 후 equilibration buffer를 조직위에 떨어뜨린 후 플라스틱 덮개로 덮어 실온에서 10분간 반응시켰다. 플라스틱 덮개를 벗겨 남아있는 용액을 제거한 후 TdT를 떨어뜨리고 플라스틱 덮개로 다시 덮어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반동안 반응시켰다. 플라스틱 덮개를 제거하고 working strength stop/wash buffer에 담그어 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 두었다가 수세하고 anti-digoxigenin-peroxidase를 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시킨 후 발색하였다.

바. Western blot (iNOS)

-80 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관된 신장 조직을 꺼내어 원침 시킨 후 sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 10mmol/L Tris-HCL, 10% glycerol)로 부유 시켜 용해시키고 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 채취 하였다. 전체 단백질의 양을 Bio-Rad kit를 이용하여 재고 SDS와 β -mercaptoethanol이 든 sample buffer를 섞어 모든 검체에서 단백질의 양을 일정하게 맞추었다. 7.5% SDS-polyacrylamide 한천 전기영동 시행 후 Hybond-ECL membrane에 transfer buffer를 사용하여 전기적으로 전사하였다. 전사된 Hybond-ECL membrane을 incubation tray에 넣은 후 5% skim milk가 포함된 Tris Bufferd Saline (TBS)을 사용하여 실온에서 1시간 blocking시켰다. iNOS (mouse monoclonal IgG, Transduction laboratories, Lexington, KY)항체를 TBS로 1:1000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 0.05% Tween 20이 포함된 TBS로 3회 세

척하였다. 2차 항체 (horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG, Santa Cruz, CA, USA)를 1차 항체와 마찬가지로 1:1000배로 희석하여 1시간 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 membrane에 기질용액을 첨가하여 발색을 유도하고 chemiluminescence (Amersham Life Science, Little chalfont, UK)를 이용하여 iNOS 단백질 발현을 확인한 후 densitometry를 이용하여 정량분석 하였다.

사. 통계 처리

측정 변수들의 통계적인 검증은 SPSS 프로그램을 이용하여 Mann-Whitney test를 사용하였고 p값이 0.05 미만인 경우를 유의 있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 노화 쥐와 젊은 쥐에서 몸무게와 신장의 무게 비교

노화 쥐의 몸무게는 $670.7 \pm 80.8\text{g}$ 로 젊은 쥐의 몸무게 $319.4 \pm 37.8\text{g}$ 에 비해 월등히 컸으며 신장의 무게도 노화 쥐에서 $2.4 \pm 0.5\text{g}$ 으로 젊은 쥐 신장의 무게 $1.5 \pm 0.2\text{g}$ 보다 컸다. 일측 신절제 후에 젊은 쥐에서는 몸무게가 1주 후에 $343.5 \pm 11.6\text{g}$, 3주 후에 $390.3 \pm 35.0\text{g}$, 5주 후에 $387.3 \pm 11.8\text{g}$ 이었고 신장의 무게는 1주 후에 $1.8 \pm 0.3\text{g}$, 3주 후에 $2.1 \pm 0.4\text{g}$, 5주 후에 $1.8 \pm 0.2\text{g}$ 으로 몸무게와 신장의 무게가 같이 커졌으며, 노화 쥐에서는 몸무게가 일측 신절제 1주 후 $706.1 \pm 115.6\text{g}$, 3주 후에 $722.1 \pm 37.7\text{g}$, 5주 후에 $758.3 \pm 66.9\text{g}$ 이었고 신장의 무게는 일측 신절제 1주 후에 $1.9 \pm 0.3\text{g}$, 3주 후에 $2.0 \pm 0.1\text{g}$, 5주 후에 $2.2 \pm 0.2\text{g}$ 으로 몸무게에 비해 신장의 무게는 증가하지 않았다. 한쪽 신장의 무게/몸무게의 비율을 비교했을 때 일측 신절제 전 및 후 모두에서 노화 쥐와 젊은 쥐간에 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). Sham operation 시행 5주 후 젊은 쥐에서 몸무게는 $420 \pm 44.2\text{g}$, 신장의 무게는 $1.6 \pm 0.1\text{g}$ 이었고 노화 쥐에서 몸무게는 $749.0 \pm 79.2\text{g}$, 신장의 무게는 $2.0 \pm 0.3\text{g}$ 이었다.

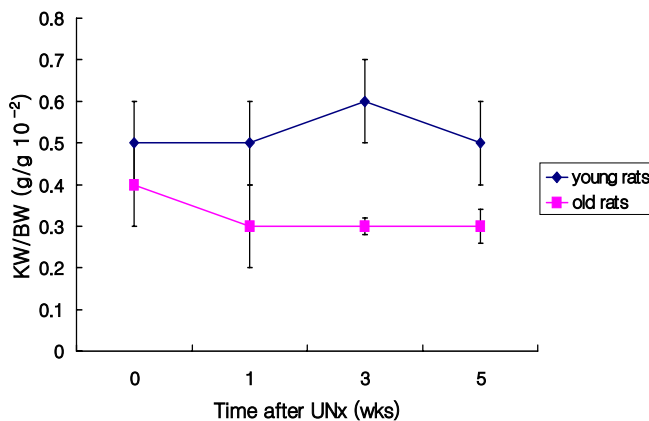


Fig. 1. A ratio of KW/BW ($\text{g/g } 10^{-2}$) of young and old rats after uninephrectomy. There is no significant difference between young and old rats (BW, body weight; KW, kidney weight; UNx, uninephrectomy).

2. 혈청 크레아티닌치, 24시간 단백뇨와 소변내 NO 비교

혈청 크레아티닌치는 젊은 쥐에서 $0.5 \pm 0.04 \text{mg/dl}$, 노화 쥐에서 $1.0 \pm 0.2 \text{mg/dl}$ 로 노화 쥐에서 높았다. 일측 신절제 후에 젊은 쥐에서 혈청 크레아티닌치가 증가하였으나 ($p < 0.05$)(Fig. 2A) 노화 쥐에서는 혈청 크레아티닌치의 증가가 없었다. 24시간 단백뇨는 젊은 쥐에서 $18.1 \pm 5.9 \text{mg/dl}$, 노화 쥐에서 $32.1 \pm 21.0 \text{mg/dl}$ 로 노화 쥐에서 높았으나 통계적인 의의는 없었다. 젊은 쥐에서 일측 신절제 1주 후에 24시간 단백뇨가 $25.0 \pm 8.8 \text{mg/dl}$, 3주 후에는 $24.8 \pm 7.2 \text{mg/dl}$, 5주 후에는 $17.7 \pm 2.8 \text{mg/dl}$ 로 대조군보다 높았으나 통계적인 의의는 없었다. 노화 쥐에서는 일측 신절제 1주 후에 24시간 단백뇨가 $31.9 \pm 33.9 \text{mg/dl}$, 3주 후에 $23.4 \pm 7.5 \text{mg/dl}$, 5주 후에 $54.3 \pm 57.1 \text{mg/dl}$ 로 일측 신절제 5주 후에 증가하였으나 통계적인 의의는 없었다 (Fig. 2B). 소변내 NO는 젊은 쥐에서 $66.5 \pm 4.0 \mu\text{M}$, 노화 쥐에서 $60.4 \pm 36.5 \mu\text{M}$ 로 차이를 보이지 않았고 일측 신절제 후 젊은 쥐에서는 변화가 없었으나 노화 쥐에서는 소변내 NO가 의의 있게 증가하였다 ($p < 0.05$)(Fig. 2C).

3. 노화 쥐와 젊은 쥐 신장의 조직학적 소견

젊은 쥐에서 대조군과 일측 신절제 후에 사구체 전경화증과 국소 경화증이 관찰되지 않았다. 노화 쥐에서는 대조군에서 전경화증이 $0.4 \pm 0.1\%$, 국소 경화증이 $3.5 \pm 6.9\%$ 관찰되어 젊은 쥐보다 국소 경화증이 의의있게 증가하였다 ($p < 0.05$). 일측 신절제 1주 후에 사구체 전경화증이 $0.1 \pm 0.4\%$, 국소 경화증이 $1.4 \pm 1.5\%$ 관찰되었고 일측 신절제 3주 후에는 국소 경화증이 $0.4 \pm 0.7\%$ 관찰되었으며 일측 신절제 5주 후에는 전경화증이 $0.1 \pm 0.4\%$, 국소 경화증이 $2.6 \pm 5.6\%$ 관찰되어 일측 신절제 후에도 사구체 경화증의 증가는 뚜렷하지 않았다. 젊은 쥐에서 간질의 염증 세포 침윤은 관찰

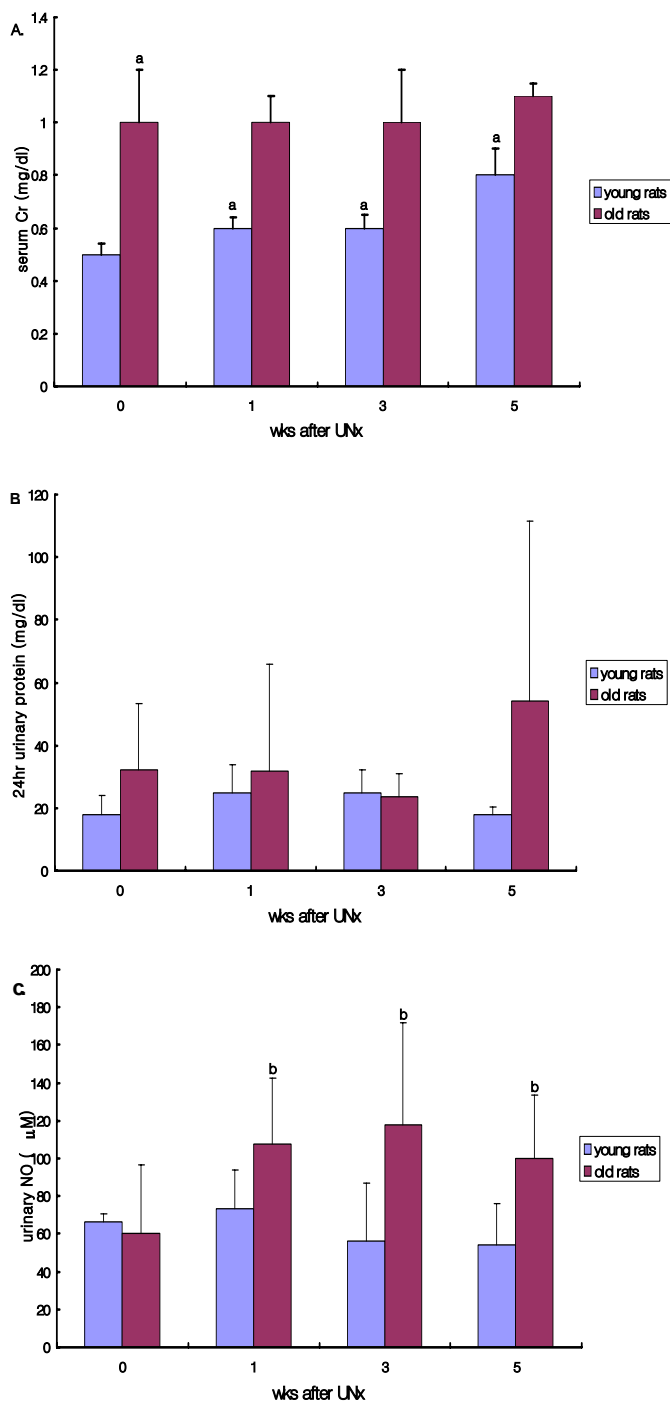


Fig. 2. The serum creatinine (A), 24hr urinary protein (B), and urinary NO (C) in young and old rats after uninephrectomy (NO, nitric oxide; Data are expressed as mean \pm SD; ^a, $p < 0.05$ vs. young rats control, ^b, $p < 0.05$ vs. old rats control).

되지 않았고 일측 신절제 후에는 경도의 염증 세포 침윤이 관찰되었다. 노화 쥐에서는 10예중 5예에서 경도의 염증 세포 침윤이 관찰되어 젊은 쥐보다 염증 세포 침윤이 유의있게 많았으나 ($p<0.05$) 일측 신절제 후에 염증 세포 침윤은 증가하지 않았다. 간질의 섬유화는 젊은 쥐와 노화 쥐의 대조군과 신절제 후 모두에서 관찰되지 않았다 (Table 1).

Table 1. Renal histology of young and old rats after uninephrectomy

| Group | | n | Glomerulosclerosis | | Interstitial | Interstitial |
|-------------------------|----------|----|--------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| | | | GS(%) | SS(%) | inflammation score | fibrosis score |
| Young rats (6-8 wks) | Control | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | UNx 1wk | 6 | 0 | 0 | 0.3±0.5 | 0 |
| | UNx 3wks | 6 | 0 | 0 | 0.2±0.4 | 0 |
| | UNx 5wks | 6 | 0 | 0 | 0.3±0.5 | 0 |
| Old rats (12mos) | Control | 10 | 0.4±0.1 | 3.5±6.9 ^a | 0.5±0.5 ^a | 0 |
| | UNx 1wk | 8 | 0.1±0.4 | 1.4±1.5 | 0.1±0.4 | 0 |
| | UNx 3wks | 8 | 0 | 0.4±0.7 | 0.6±0.5 | 0 |
| | UNx 5wks | 8 | 0.1±0.4 | 2.6±5.6 | 1.0±0.9 | 0 |

(GS, global sclerosis; SS, segmental sclerosis; control, kidney extract from uninephrectomy; UNx 1wk, contralateral kidney 1week after uninephrectomy; UNx 3wks, contralateral kidney 3 weeks after uninephrectomy; UNx 5wks, contralateral kidney 5 weeks after uninephrectomy; Data are expressed as means ± SD; ^a, $p<0.05$ vs. young rats control)

4. 세포증식능과 세포고사의 비교

PCNA 염색을 통한 세포증식능 비교에서 젊은 쥐에서는 사구체에서 0.6 ± 0.4 개, 세뇨관-간질에서 144.2 ± 72.2 개, 노화 쥐에서는 사구체에서 0.1 ± 0.1 개, 세뇨관-간질에서 76.0 ± 36.3 개의 세포에서 양성반응을 보여 사구체와 세뇨관-간질 모두에서 노화 쥐보다 젊은 쥐에서 세포증식능이 컸다. 일측 신절제 1주 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 세뇨관-간질의 PCNA의 발현이 유의 있게 증가하였으나 3주, 5주 후에는 신절제 1주 후보다

PCNA 발현이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3A). TUNEL assay를 통해 세포 고사를 보이는 세포를 관찰했을 때 사구체에서는 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 세포 고사가 관찰되지 않았고 세뇨관-간질에서는 젊은 쥐에서 6.3 ± 6.0 개, 노화 쥐에서는 32.5 ± 2.8 개가 관찰되어 노화 쥐에서 젊은 쥐보다 세포고사가 많았으나 통계적인 의의는 없었다. 일측 신절제 후에 세포 고사가 젊은 쥐와 노화 쥐에서 모두 세포고사의 증가를 보였는데 (Fig. 3B) 특히 젊은 쥐에서 일측 신절제 5주 후에 세포고사가 크게 증가하였다 (Table 2).

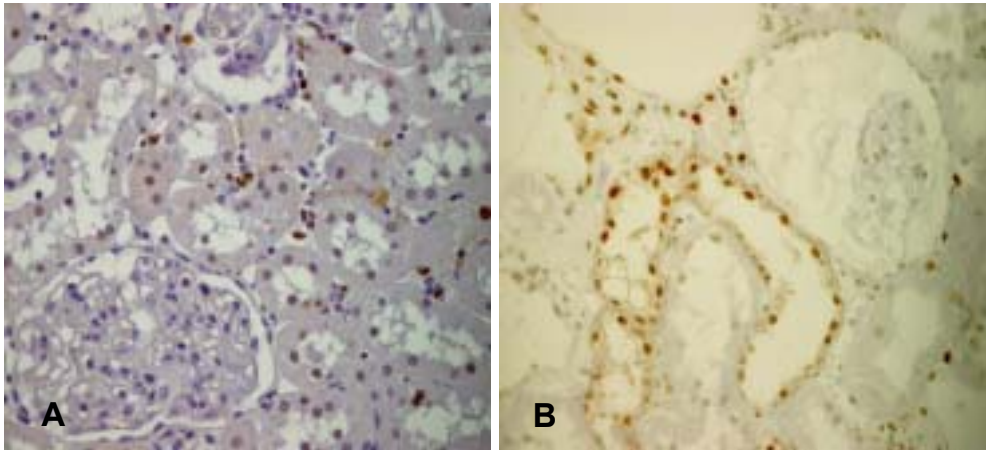


Fig. 3. PCNA (A) and TUNEL (B) staining of kidney of old rats 3 weeks after uninephrectomy.

Table 2. The number of PCNA and TUNEL positive cells in young and old rats after uninephrectomy.

| Group | n | PCNA | | TUNEL | | |
|------------|----------|-----------|----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|
| | | Glomeruli | Tubulointerstitium | Glomeruli | Tubulointerstitium | |
| Young rats | Control | 10 | 0.6±0.4 | 144.2±72.2 | 0 | 6.3±6.0 |
| (6-8 wks) | UNx 1wk | 6 | 0.4±0.2 | 251.8±81.8 ^a | 0.06±0.1 | 98.7±164.6 ^a |
| | UNx 3wks | 6 | 0.6±0.3 | 107.8±37.1 | 0.1±0.1 | 119.2±73.4 ^a |
| | UNx 5wks | 6 | 0.6±0.4 | 94.2±51.5 | 0.04±0.1 | 692.4±361.3 ^a |
| Old rats | Control | 10 | 0.1±0.1 ^a | 76.0±36.3 ^a | 0 | 32.5±2.8 |
| (12 mos) | UNx 1wk | 8 | 0.3±0.2 ^b | 170.4±74.7 ^b | 0 | 20.1±10.6 |
| | UNx 3wks | 8 | 0.4±0.2 ^b | 112.0±37.9 | 0.01±0.02 | 88.9±140.1 ^b |
| | UNx 5wks | 8 | 0.3±0.2 ^b | 126.3±78.9 | 0 | 66.1±74.4 ^b |

(PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling; control, kidney extract from uninephrectomy; UNx 1wk, contralateral kidney 1week after uninephrectomy; UNx 3wks, contralateral kidney 3 weeks after uninephrectomy; UNx 5wks, contralateral kidney 5 weeks after uninephrectomy; Data are expressed as means ± SD, ^a, p<0.05 vs. young rats control, ^b, p<0.05 vs. old rats control)

5. 대식세포 침윤과 iNOS 발현의 비교

대식세포 침윤을 보기 위해 ED-1에 대한 면역조직 화학염색을 시행한 결과 사구체에서는 젊은 쥐에서 0.6±0.3개, 노화 쥐에서는 0.4±0.2개의 양성세포를 보여 노화 쥐보다 젊은 쥐에서 대식세포 침윤이 유의 있게 많았다 (p<0.05). 세뇨관-간질에서는 젊은 쥐에서 119.1±44.2개의 대식세포가 침윤하였고 노화 쥐에서는 194.3±141.1개의 대식세포가 침윤하고 있어 노화 쥐에서 대식세포가 더 많이 침윤하였다 (p<0.05). 일측 신절제 후 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 사구체에서는 대식세포 침윤이 증가하지 않았으나 세뇨관-간질에서는 대식세포 침윤이 증가하였으며 젊은 쥐에서만 통계적인 유의성이 있었다 (Fig. 4A). iNOS 발현은 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 드

물게 관찰되었는데 사구체와 세뇨관에서는 거의 발현되지 않았고 주로 간질에 침윤된 염증세포에서 발현되었다. 일측 신절제 후 세뇨관-간질의 iNOS 발현은 젊은 쥐에서는 1주, 3주 후에 유의 있게 증가하였고 노화 쥐에서는 증가하는 경향은 보였으나 통계적인 유의는 없었다 (Fig. 4B)(Table 3).

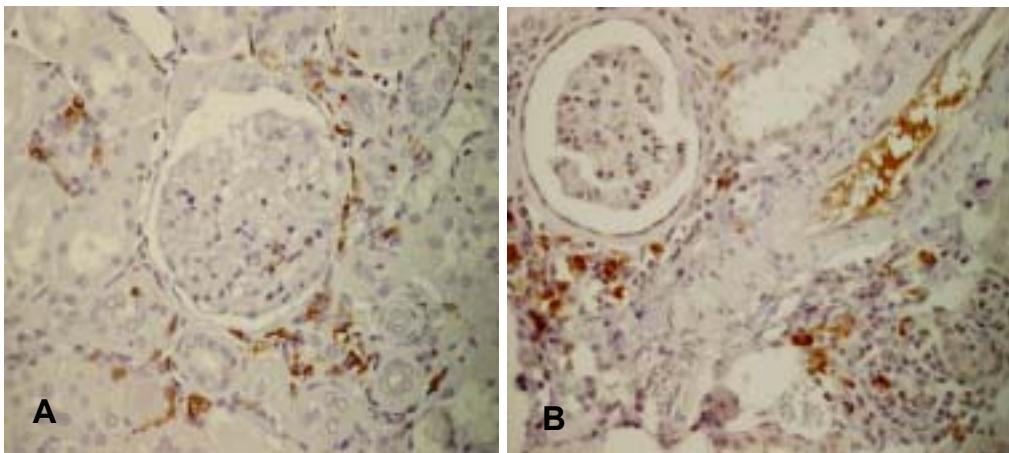


Fig. 4. ED-1 (A) and iNOS (B) staining in kidney of old rats 5 weeks after uninephrectomy.

Table 3. The number of ED-1 and iNOS positive cells in young and old rats after uninephrectomy.

| Group | | n | ED-1 | | iNOS | |
|-------------------------|----------|----|----------------------|--------------------------|------------|----------------------|
| | | | Glomeruli | Tubulointerstitium | Glomeruli | Tubulointerstitium |
| Young rats (6-8 wks) | Control | 10 | 0.6±0.3 | 119.1±44.2 | 0 | 0 |
| | UNx 1wk | 6 | 0.8±0.5 | 208.±053.0 ^a | 0 | 2.3±2.3 ^a |
| | UNx 3wks | 6 | 1.0±0.3 ^a | 163.5±22.6 ^a | 0 | 2.5±1.1 ^a |
| | UNx 5wks | 6 | 0.9±0.3 | 185.5±77.7 ^a | 0 | 0.2±0.4 |
| Old rats (12 mos) | Control | 10 | 0.4±0.2 ^a | 194.3±141.1 ^a | 0 | 0.9±2.3 |
| | UNx 1wk | 8 | 0.5±0.3 | 359.6±200.1 | 0.004±0.01 | 1.3±2.1 |
| | UNx 3wks | 8 | 0.5±0.4 | 233.9±127.6 | 0.01±0.04 | 7.0±9.4 |
| | UNx 5wks | 8 | 0.3±0.1 | 327.3±262.6 | 0 | 9.3±11.0 |

(ED-1, a marker of macrophages and monocytes; iNOS, inducible nitric oxide synthase; control, kidney extract from uninephrectomy; UNx 1wk, contralateral kidney 1week after uninephrectomy; UNx 3wks, contralateral kidney 3 weeks after uninephrectomy; UNx 5wks, contralateral kidney 5 weeks after uninephrectomy; Data are expressed as means ± SD, ^a, p<0.05 vs. young rats control)

6. iNOS 단백질에 대한 Western blot 결과

iNOS 단백질에 대한 Western blot을 시행하고 densitometry를 이용하여 노화 쥐의 대조군을 1로 기준하여 상대적인 optical density(OD)를 구한 결과 젊은 쥐의 대조군에서는 iNOS에 대한 OD가 0.3으로 미약하게 관찰되었고 일측 신절제 1주 후에 2, 3주 후에 0.1, 5주 후에는 1.7로 일측 신절제 후에 약간 증가하였다. 노화 쥐에서는 대조군을 1로 기준하여 일측 신절제 1주 후에 0.8로 iNOS 발현이 미약하였고, 3주 후에 3, 5주 후에 4로 일측 신절제 3주, 5주 후에는 iNOS 발현의 증가가 관찰되었다 (Fig. 5).

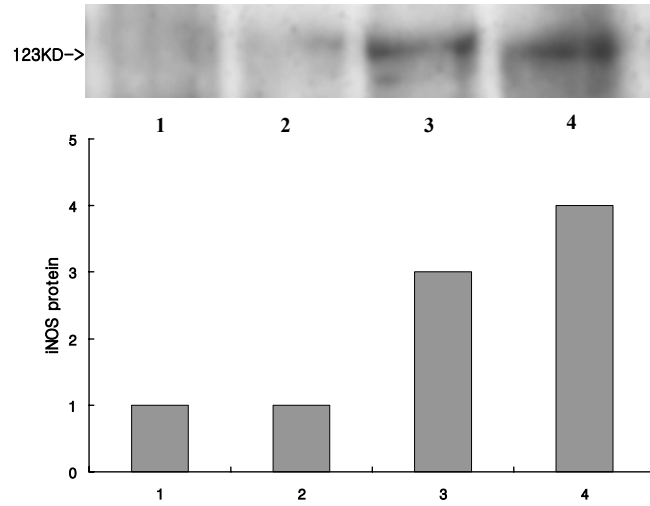


Fig. 5. A representative iNOS protein expression in kidney of old rats. Values are the intensity of densitometric readings of iNOS protein. Lane 1, old rats, control; Lane 2, old rats, 1 week after uninephrectomy; Lane 3, old rats, 3 weeks after uninephrectomy; Lane 4, old rats, 5 weeks after uninephrectomy.

IV. 고찰

노화 신장에 관한 연구는 대부분 쥐에서 많이 이루어져 있는데, 특히 SD계 쥐는 노화가 진행되면서 단백뇨와 사구체 경화증이 출현한다^{15,21}. SD계 쥐는 생후 약 8주가 지나면 번식력이 생기고 약 12개월부터는 노화의 여러 변화가 시작되며 20개월이 되면 50%가 사망한다고 알려져 있다^{6,15,21-23}. 본 연구에서는 12개월 된 SD계 웅성 쥐를 실험에 이용하였으며, 노화 쥐에서 일측 신절제를 시행하였을 때 잔여 신장의 기능 및 형태학적 변화를 관찰하고 젊은 쥐와의 차이점을 찾아봄으로써 일측 신절제가 노화 신장에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 일측 신절제 후 몸무게당 신장의 무게비는 노화 쥐에서 증가하지 않았으며 젊은 쥐와도 차이를 보이지 않았다. 또한 단백뇨 및 신장의 조직학적 변화도 뚜렷치 않았다. 이는 12개월 된 노화 쥐에서의 일측 신절제의 효과는 젊은 쥐에서와 비슷하다고 생각할 수 있다. 신장의 무게는 신장 구성세포의 크기 및 수에 영향을 받을 수 있다. 신장 세포수는 세포 증식과 고사간의 균형에 의해 유지된다. Thomas 등은 3개월 된 젊은 쥐 8마리와 24개월된 노화 쥐 9마리에서 세포고사와 PCNA발현을 비교하였는데 세뇨관-간질에서 PCNA발현은 젊은 쥐와 노화 쥐에서 차이가 없는 반면 세포고사는 젊은 쥐 보다 노화 쥐에서 높아 노화가 진행되면서 전체 세포수가 감소한다고 하였다⁸. 본 연구에서 일측 신절제 전 노화 쥐의 세뇨관-간질과 사구체내 PCNA발현은 젊은 쥐보다 낮아 Thomas 등의 연구결과와 달랐으나, 세뇨관-간질에서의 세포고사는 젊은 쥐보다 높아 Thomas 등의 연구와 동일하였다. 일측 신절제 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 세뇨관-간질내 PCNA발현이 1주 후부터 현저히 증가하였으며 세포고사는 젊은 쥐에서는 1주 후에 노화 쥐에서는 3주 후부터 증가하였다. 그

러나 Nakajima 등은 240-260g의 젊은 SD계 쥐들을 일측 신절제 한 결과 PCNA 발현은 증가하고 세포고사와 DNA 분절은 감소한다고 하였다²⁴. 이처럼 상반된 연구결과를 보이는 이유는 실험동물 및 연구방법의 차이일 수 있다. Thomas 등은 24개월된 쥐를 사용하였으나 본 연구에서는 12개월된 쥐를 사용하였다. Nakajima 등의 신절제 실험은 젊은 쥐를 대상으로 하였으며 48시간 후 세포증식과 고사를 평가하였으나 본 연구는 노화 쥐에서 일측 신절제 1, 3, 5주 후에 세포 증식과 고사를 평가하였다. 또 Nakajima 등이 고배율의 광학현미경 검색하에 염색체 농축을 동반한 핵 분절을 보이는 세포만 세포고사에 포함시킨 반면, 본 연구에서는 TUNEL assay를 통해 광학현미경으로 알기 어려운 초기 단계의 세포고사까지 검출하여 세포고사의 비율이 높았던 것으로 생각된다. 본 연구 결과 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 일측 신절제 후 초기에 세포증식이 증가하여 세포고사도 같이 증가하지만 세포증식이 3주 후부터는 신절제 전과 큰 차이가 없는 반면 세포고사는 3주 후에도 지속적으로 증가하므로 시간이 경과됨에 따라 전체 세포 수가 점차 감소할 것으로 추정된다. 한편 신장의 무게에 영향을 줄 수 있는 신장 세포의 비후 유무 및 정도는 본 연구에서 형태계측을 시행하지 못하여 확인할 수 없었다.

노화 신장 및 신절제 후 남은 신장에서 혈액 역동학적 및 조직학적 변화를 유발하는 매개체에 대해서는 아직 분명하게 알려져 있지 않다. NO는 혈관 저항과 신장 혈액 유동 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으므로²⁵ 노화 신장의 손상에 관여할 가능성이 높다. NO 형성에 관여하는 NOS에는 eNOS, nNOS와 iNOS의 세가지 형태가 있는데 이중 iNOS의 역할이 신손상에 중요할 것으로 보고되고있다. Valdivielso등은 250g의 웅성 Wistar계 쥐에서 일측 신절제를 시행한 후 사구체 내 NOS를 관찰하였는데 일측 신절제 군에서 eNOS와 nNOS의 효소 활성도는 sham operation

그룹과 차이가 없었으나 iNOS는 sham operation 그룹보다 발현이 높았으며, 따라서 일측 신절제 군에서는 증가된 iNOS가 NO의 합성을 증가시켜 혈관저항을 감소시키고 혈류량을 증가시키는 역할을 한다고 하였다²⁰. Fujihara등은 sham operation과 5/6 신절제를 시행한 두 그룹의 쥐들에서 60일이 경과된 후 신장을 관찰했을 때 nNOS와 eNOS의 발현은 sham operation을 시행한 쥐와 5/6 신절제를 시행한 쥐에서 차이가 없었으나, iNOS의 발현은 sham operation을 시행한 쥐보다 5/6 신절제를 시행한 쥐에서 증가되어 iNOS에 의한 NO 생성 증가가 신절제 후 신손상의 중요한 매개체 역할을 하며 신부전으로의 진행을 촉진한다고 하였다²⁵. 본 연구에서도 노화 쥐에서는 신절제 후 소변내 NO가 증가하고, 신장의 세뇨관-간질내 iNOS 염색이 증가하였으며 신장의 iNOS 단백질 발현이 3주와 5주째 증가하여 신손상에 iNOS가 관여함을 알 수 있었다. 또 iNOS는 주로 간질에 침윤된 염증세포에서 염색되어 일측 신절제 후 간질내 증가된 ED-1 양성 대식세포가 iNOS의 기원이라는 것을 알 수 있었다. 그러나 사구체에서는 iNOS 염색이 일측 신절제 전 및 후에도 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 뚜렷한 차이를 보이지 않아 일측 신절제 후 사구체에서 iNOS 발현이 증가되었다는 Valdivielso 등의 연구 결과와 상반되었다. 그 이유는 분명치않으나 Valdivielso등의 연구는 일측 신절제 48시간 후 실험 결과이며 본 연구는 일측 신절제 후 1, 3, 5주 후 실험 결과로 실험 기간의 차이 때문일 수도 있다.

이로써 노화 신장에서 일측 신절제가 남은 한쪽 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 12개월된 노화 쥐와 6-8주된 젊은 쥐와 비교해 실험해 본 결과 노화 쥐에서 일측 신절제 후 소변 내 NO 증가, 간질 내 대식세포 침윤 및 iNOS 염색 증가, 신장의 iNOS 단백질 표현이 증가되었으나 신장의 기능적, 구조적 변화에 현저한 영향은 미치지 않음을 알았다. 일측 신절제

는 초기에는 세포증식과 세포고사가 같이 증가하여 전체 세포수의 균형을 유지하나, 점차 세포고사가 증가하여 세포수가 감소할 것으로 생각된다. 하지만 본 연구는 노화 쥐에서 일측 신절제 후 1, 3, 5주 동안의 단기간 추적 관찰의 결과이며 장기간 추적 관찰 시 어떠한 변화를 보일 지에 대해서는 좀 더 연구가 필요하리라고 생각된다.

V. 결론

노화 쥐에서 일측 신절제가 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 12개월된 노화 SD계 웅성 쥐 24마리와 6~8주된 젊은 SD계 웅성 쥐 18마리에서 신장의 구조적, 기능적 변화를 알아보고 PCNA, TUNEL assay, iNOS와 ED-1의 발현을 비교해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 일측 신절제 후 몸무게당 신장의 무게비는 노화 쥐에서 증가하지 않았으며 젊은 쥐와도 차이를 보이지 않았다. 노화 쥐에서 젊은 쥐에 비해 24시간 단백뇨 증가를 보이지 않았으며 일측 신절제 후에도 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 24시간 단백뇨가 증가하지 않았다. 혈청 크레아티닌치는 젊은 쥐보다 노화 쥐에서 높았으나 일측 신절제 후에 노화 쥐에서 혈청 크레아티닌치의 증가는 없었다.

2. 노화 쥐의 신장에서 젊은 쥐에 비해 사구체의 경화증과 간질의 염증세포 침윤이 많았으나 일측 신절제 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 사구체 경화증과 간질의 염증세포 침윤은 증가하지 않았다.

3. 세포증식능은 노화 쥐보다 젊은 쥐에서 컸는데 사구체에서는 PCNA 발현에 차이가 없었고 세뇨관과 간질에서는 노화 쥐보다 젊은 쥐에서 컸다. 일측 신절제 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 PCNA의 발현이 1주 후에 현저히 증가하였으나 3주, 5주 후에는 1주에 비해 감소하였다. 세포고사는 젊은 쥐와 노화 쥐에서 모두 사구체에서는 드물게 관찰되었고 세뇨관-간질에서는 젊은 쥐에 비해 노화 쥐에서 세포고사가 많았으나 통계적인 의미는 없었다. 일측 신절제 후에 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 세포고사의

증가를 보였는데, 젊은 쥐에서는 1주 후에, 노화 쥐에서는 3주 후부터 증가하였다.

4. 대식세포의 침윤은 노화 쥐에서 젊은 쥐에 비해 사구체와 세뇨관-간질 모두에서 많았고 일측 신절제 후에는 노화 쥐와 젊은 쥐 모두에서 대식세포 침윤이 증가하는 경향을 보였다. iNOS 발현은 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 드물게 관찰되었는데 일측 신절제 후에는 iNOS 발현이 젊은 쥐와 노화 쥐 모두에서 증가하였으나 젊은 쥐에서만 통계적인 의의를 보였다. 소변내 NO는 일측 신절제 후 노화 쥐에서 증가하였고 iNOS 단백질에 대한 Western blot 결과 노화 쥐에서 일측 신절제 3주, 5주째 iNOS 발현이 증가하였다.

이상의 결과로 12개월 된 쥐에서 일측 신절제는 소변 내 NO 증가, 간질 내 대식세포 침윤 및 iNOS 염색 증가, 신장의 iNOS 단백질 표현 증가를 유발하나 신장의 기능적, 구조적 변화에 현저한 영향은 미치지 않음을 알았다. 일측 신절제는 초기에는 세포증식과 세포고사가 같이 증가하여 전체 세포수의 균형을 유지하나, 점차 세포고사가 증가하여 세포수가 감소할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Schaefer L, Teschner M, Ling H, Oldakowska U, Heidland A, Schaefer RM. The aging rat kidney displays low glomerular and tubular proteinase activities. *Am J Kidney Dis* 1994;24:499-504.
2. Baylis C, Schmidt R. The aging glomerulus. *Semin Nephrol* 1996;16:265-76.
3. Epstein M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1106-22.
4. Floege J, Hackmann B, Kliem V, Kriz W, Alpers CE, Johnson RJ, et al. Age-related glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in Milan normotensive rats: a podocytes disease. *Kidney Int* 1997;51:230-43.
5. Rodriguez-Puyol D. The aging kidney. *Kidney Int* 1998;54:2247-65.
6. Balyis C, Corman B. The aging kidney: insights from experimental studies. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:699-709.
7. Beck LH. The aging kidney. defending a delicate balance of fluid and electrolytes. *Geriatrics* 2000;55:26-8.
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;9:231-41.
9. Bertani T, Zoja C, Abbate M, Rossini M, Remuzzi G. Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content. *Lab Invest* 1989;60:196-204.
10. Zalups RK, Stanton BA, Wade JB, Giebisch G. Structural

adaptation in initial collecting tubule following reduction in renal mass. *Kidney Int* 1985;27:636-42.

11. Liu P, Gallery ED, Grigg R, Mahony JF, Gyory AZ. Renal function in unilateral nephrectomy subjects. *J Urol* 1992;147:337-9.

12. Kasiske B, Ma JZ, Louis TA, Swan S. Long-term effects of reduced renal mass in humans. *Kidney Int* 1995;48:814-9.

13. Koide H, Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y. Effect of unilateral nephrectomy on gene expression of metalloproteinases and their inhibitors. *Nephron* 1997;75:479-83.

14. Valentin JP, Sechi LA, Griffin CA, Humphreys MH, Schambelan M. The renin-angiotensin system and compensatory renal hypertrophy in the rat. *Am J Hypertension* 1997;10:397-402.

15. 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.

16. Toronyi E, Alföldy F, Jaray J, Rempert A, Hidvegi M, Dabasi G, et al. Evaluation of the state of health of living related kidney transplantation donors. *Transpl Int* 1998;11(Suppl 1):S57-S59.

17. Haylor JL, McKillop IH, Oldroyd SD, El Nahas MA. IGF-I inhibitors reduce compensatory hyperfiltration in the isolated rat kidney following unilateral nephrectomy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:87-92.

18. Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 2002;90:373-8.

19. Reckelhoff JF, Kanji V, Racusen LC, Schmidt AM, Yan SD, Morrow J, Roberts II LJ, et al. Vitamin E ameliorates enhanced renal

lipid peroxidation and accumulation of F₂-isoprostanes in aging kidneys. Am J Physiol 1998;274:R767-74.

20. Valdivielso JM, Perez-Barriocanal R, Garcia-Estan J, Lopez-Novoa JM. Role of nitric oxide in the early renal hemodynamic response after unilateral nephrectomy. Am J Physiol 1999;276:R1718-23.

21. Goldstein RS, Tarloff JB, Hook JB. Age-related nephropathy in laboratory rats. FASEB J 1988;2:2241-51.

22. Couser WG, Stilmant MM. Mesangial lesions and focal glomerular sclerosis in the aging rat. Lab Invest 1975;33:491-501.

23. Couser WG, Stilmant MM. The immunopathology of the aging rat kidney. J Gerontol 1976;31:13-22.

24. Nakajima T, Miyaji T, Kato T, Ikegaya N, Yamamoto T, Hishida A. Uninephrectomy reduces apoptotic cell death and enhances renal tubular cell regeneration in ischemic ARF in rats. Am J Physiol 1996;271:F846-53.

25. Fujihara CK, Mattar AL, Vieira JM, Malheiros DMAC, Noronha IL, Goncalves ARR, et al. Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. J Am Soc Nephrol 2002;13:2278-87.

Abstract

Effect of unilateral nephrectomy on aging rat kidney

Kye Won Kwon

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyeon Joo Jeong)

Despite an increased usage of old donor kidneys in renal transplantation, no attention has been directed to the structural and functional changes occurring in the remnant kidney of the old donor. In this study, the functional and structural changes were assessed in the remnant kidney of old rats after uninephrectomy (UNx) and compared with that of young rats.

Twenty-four 12-month-old and eighteen 6~8-week-old Sprague-Dawley (SD) male rats underwent UNx. The extract kidneys were used as control. Each of those groups was divided into three subgroups (n=8 in each in 12-month-old rats, n=6 in each in 6~8-week-old rats). Following 1, 3, and 5 weeks after UNx, the rats were sacrificed, sequentially. Serum creatinine, 24hr urinary protein excretion, and urinary nitric oxide (NO) were measured. The extract kidneys were

examined for histologic changes, such as glomerulosclerosis, interstitial inflammation, and interstitial fibrosis. Immunohistochemical stains for ED-1 (a marker of macrophages and monocytes), inducible NO synthase (iNOS), and PCNA and TUNEL assay for apoptosis, and Western blot (iNOS) were performed.

There was no difference in the 24hr urine protein and urinary NO between old and young rats. However, the mean serum creatinine level was higher in old rats compared with that of young rats. After UNx, urinary NO level was significantly increased in old but not young rats, without accompanying a significant increase of the 24hr urine protein or serum creatinine. By light microscopy, there were no changes in the degree of glomerulosclerosis, interstitial inflammation, and interstitial fibrosis in remnant kidneys of young and old rats after UNx. The PCNA indices were higher in glomeruli and tubulointerstitium of young rats than in those of old rats, while the TUNEL indices were not different between the two groups. After UNx, PCNA and TUNEL indices were increased in remnant kidney of both young and old rats. There were more ED-1 positive cells present in the interstitium of old rats than young rats. After UNx, the number of ED-1 positive cells, immunostaining for iNOS in renal interstitial mononuclear cells and renal iNOS protein expression were increased in remnant kidneys after UNx in old rats, but the values were not significantly different from those of young rats.

Although urinary NO and renal iNOS were increased in 12-month-old rats after UNx, UNx does not seem to affect the renal

function or structural changes significantly. Since TUNEL indices but not PCNA indices were persistently increased after UNx, longer observation period may be required to predict long-term renal function in old rats.

Key Words : uninephrectomy, old rats, PCNA, apoptosis, iNOS