

# Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)이 신생 흰쥐의 보상성신비대 과정 중 신기능에 미치는 효과

## Effect of Insulin-like Growth Factor-I on Renal Function During Compensatory Renal Hypertrophy in Neonatal Rats

Chul Kyu Cho, Tong Choon Park, Sang Won Han\*

From the Department of Urology, Yeungnam University College of Medicine, Taegu, Korea and the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine,\* Seoul, Korea

**Purpose:** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is known to increase renal function when administered in vivo, and nitric oxide (NO) is known to play a dominant role in the homeostatic regulation of glomerular, vascular and tubular function under normal and pathological conditions. To elucidate the effect of externally administered IGF-I during compensatory renal hypertrophy in neonatal rats, the change in renal function, nitric oxide synthase (NOS) activity and expression of endothelial NOS (eNOS) mRNA were investigated.

**Materials and Methods:** Sprague-Dawley rats were classified according to the criteria of operation time and experimental methods. Unilateral nephrectomy (UNx) was performed at 7, 14, 30 days after birth and recombinant human IGF-I (rhIGF-I, 3mg/kg/day) was administered for 3 days after nephrectomy. The glomerular filtration rate (GFR) and effective renal plasma flow (ERPF) were determined in the serum. The NOS activity and expression of eNOS using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were determined in the contralateral kidney tissues.

**Results:** The GFR/g wet kidney weight, ERPF/g wet kidney weight and NOS activity were significantly increased after the administration of IGF-I in the unilaterally nephrectomized group. A significant difference in GFR/g wet kidney weight, ERPF/g wet kidney weight and NOS activity were observed in all of the 30 day groups regardless of the experimental methods. RT-PCR of eNOS in the rat renal tissue revealed an eNOS band at 819bp. The corrected densitometric values (% of sham operation group value) of eNOS band in the nephrectomized group significantly increased compared to the sham operation group regardless of IGF-I administration. A significant difference in densitometric values of eNOS band was observed in all of the 30 day groups regardless of the experimental method.

**Conclusions:** rhIGF-I improves renal function via a vasodilating mediator NO by effectively increasing renal perfusion and GFR during and after the cellular growth phase in rats. In addition, considering the fact that IGF-I administration is more effective during the neonatal period, it may facilitate improvement of renal function after renal damage during this period.

(Korean J Urol 2000; 41: 1163~71)

**Key Words:** IGF-1, Compensatory renal hypertrophy, Nitric oxide, Kidney function

대한비뇨기과학회지  
제41권 제10호 2000년

영남대학교 의과대학 비뇨기과  
학교실, 연세대학교 의과대학 비  
뇨기과학교실\*

조철규·박동춘·한상원\*

접수일자 : 2000년 6월 14일  
채택일자 : 2000년 7월 31일

교신저자 : 조 철 규  
영남대학병원 비뇨기과  
대구시 남구 대명 5동  
317-1 ☎ 705-035  
전 화 : 053) 620-3694  
e-mail : ckcho@medical.  
yeungnam.ac.kr

## 서 론

지속적인 신장 질환에 의해 신실질의 일부가 소실되거나 신장의 일부가 제거되면 남은 신장은 이를 보상하려는 신비대가 일어나 신장 기능을 유지시키며, 이는 신장 질환의 치료 후 신기능 회복의 조건이 되고, 일부 신장의 적출술이 불가피할 때 수술 당위성의 근거로 여겨져 왔다. 그러나 사구체신염을 앓은 후 치유된 환자를 장기 추적해 보면 일부 환자에서 고혈압, 단백뇨 및 혈중 크레아티닌치의 상승이 관찰되고, 폐색성 신질환의 경우에도 폐색의 교정 후에 신기능이 회복되다가 장기 추적시에는 점차적으로 신기능이 소실되는 것으로 보아 보상성신비대가 단기적으로는 소실된 신기능의 보상 역할을 수행하기 위하여 반드시 필요한 과정이지만 장기적으로는 신기능에 나쁜 영향을 줄 수도 있다. 이와 같이 보상성신비대의 양면적 특성은 신기능의 회복과 보존의 측면에서 대단히 중요한 연구 대상으로, 지금까지 많은 연구자들이 신비대와 신기능 증가의 기전을 밝혀, 보다 효과적인 신비대를 유도하려는 연구가 진행 중에 있다.

이러한 노력의 결과로 신세포 성장을 일으키는 중요한 물질로서 신성장 호르몬 (renotropic hormone)이 밝혀졌다. 그리고 이상적인 신성장 호르몬은 신장에서 직접 생산되며, 혈류역동학적인 변화를 일차적으로 일으키지 않고, 배양된 신장 세포수를 증식시키며, 보상성신비대가 나타나기 이전이나 비슷한 시기에 증가하여 보상성신비대를 유발하는데 중요한 역할을 담당할 수 있어야 하는데, 근자에 insulin-like growth factor-I (IGF-I)이 이러한 조건을 충족하고 있는 물질로 보고되고 있다.<sup>1</sup> 뇌하수체를 제거하거나 혹은 뇌하수체가 온전한 상태의 흰쥐와 마우스에게 recombinant human IGF-I (rhIGF-I)을 투여하면 신혈류량과 사구체여과율이 증가되고 신장의 무게가 증가되며,<sup>2,3</sup> 인체에서도 마찬가지로 신혈류량과 사구체여과율이 증가된다.<sup>4</sup> 또한 허혈성 신부전이 유발된 흰쥐에 rhIGF-I를 투여하면 신장의 기능이 거의 정상으로 회복되고,<sup>5</sup> 사구체여과율이 증가되며,<sup>6</sup> 허혈로 인해 손상된 근위세뇨관 상피세포가 재생된다.<sup>7</sup> 그리고 만성 신부전 환자에서도 rhIGF-I를 투여하면 신혈류량과 사구체여과율이 모두 증가된다고 보고되고 있다.<sup>8</sup> 이와 같이 신장이 건강한 상태와 병적인 상태에서 알려진 바와 같이 신장의 보상성신비대 과정 중에 투여한 rhIGF-I 효과는 사구체여과율과 신혈류량을 증가시키거나 신장의 비대를 일으킨다고 할 수 있다.

Nitric oxide (NO)는 신사구체 모세혈관의 내피세포와 mesangial cell, macula densa 등 모든 신장 세포에

서 활발히 생성되어, 보상성신비대에 관여하는 여러 가지 성장요소의 생산과 조절에 관여하는 것으로 알려졌다. 또한 최근에 신기능 및 신장 혈류역동학적인 조절이 NO의 작용에 의해 이루어진다고 보고되고 있는데, nitric oxide synthase (NOS)의 억제제인 L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) 혹은 N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)를 투여했을 경우 신혈류량 및 사구체여과율이 감소하고, 신혈관내 저항이 증가되어 신기능 감소가 일어나며,<sup>9</sup> 또한 NO를 발생시키는 전구물질인 L-arginine을 투여했을 때 신혈류량의 증가는 신세동맥의 내피세포에 주로 존재하는 endothelial NOS (eNOS)의 영향을 받는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 그리고 신생기 흰쥐는 성년기 보다 보상성신비대 과정 중 사구체여과율의 증가가 더 큼,<sup>11</sup> 이 시기 역시 신기능 유지에 NO가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>12</sup>

이 연구는 세포 증식기와 세포 증식기 이후 흰쥐에서 보상성신비대 과정 중 외부에서 투여한 rhIGF-I이 신기능의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 보상성신비대 과정의 초기에 나타나는 NO의 변화를 NOS 활성도 및 eNOS의 발현 정도를 통해 신기능 변화의 기전을 알아보자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 대상

#### 가. 실험 동물

실험 동물로는 동일 조건하에 사육된 생후 7일, 14일, 30일된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 모든 흰쥐는 신생기의 경우에 이미를, 성년기의 경우 대상 개체를 정상 단백식으로 사육하였으며, 식수공급은 제한하지 않았다.

#### 나. 실험군

실험군은 실험 방법에 따라 한쪽 신장 제거 후 rhIGF-I 투여군 (UNx+IGF-I), 한쪽 신장 제거 후 생리적 식염수 투여군 (UNx), Sham operation 후 rhIGF-I 투여군 (Sham+IGF-I), Sham operation 후 생리적 식염수 투여군 (Sham)으로 나누었으며, 각각의 군은 수술한 시기에 따라 생후 7일, 14일, 30일의 3개의 소군으로 분류하였다. 각 소군당 10마리의 흰쥐를 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 가. 한쪽 신장의 제거

흰쥐를 에테르 마취하에 측복부를 절개하고 원쪽 신장을 부신과 주변 결缔조직으로부터 분리하고 신장 혈관을 결찰하고 신장을 제거한 후, 신장의 섬유피막을 벗기고 중량을 측정하였다. 감염 방지를 위하

여 cephalothin을 개체 체중 kg당 30mg씩 복강내에 주사하였다. 대조군에서는 sham operation을 시행하였다.

#### 나. rhIGF-I의 투여

rhIGF-I (Genentech, San Francisco, CA, U.S.A.)의 투여는 한쪽 신장 제거 후 1일부터 3일까지 하루 용량이 개체 체중 kg당 3mg의 용량을 하루 3회로 나누어 투여하였다. 정상 대조군과 일측 신절제 대조군은 같은 용량의 생리적 식염수를 투여하였다. 이 연구에서 투여 기간의 결정은 NOS의 활성은 한쪽 신장 제거시 대측 신장에서 12~24시간 후 가장 활발히 나타나고,<sup>13</sup> 신기능이 감소한 상태에서 IGF-I 투여시 사구체여파율의 증가는 72시간 후 가장 많이 증가한다는 보고를 근거로 하여 정하였고,<sup>8</sup> 투여 용량의 결정은 타 연구자들의 연구 결과를 근거로 하여 정하였다.<sup>2,14</sup>

#### 다. 남은 신장의 조직과 혈장의 준비

한쪽 신장을 제거하고 3일 후 애테르 마취하에 복부를 열고 하대정맥 혹은 심장으로부터 사구체여파율과 효과적 신혈류량을 측정하기 위한 채혈을 한 다음, 신장 동맥의 근위에 있는 대동맥을 막고, 대정맥을 절단한 후 대동맥에 삽관하여 37°C의 100ml Krebs-Ringers-Phosphate 완충액 (pH 7.4, 125mM NaCl, 5mM KCl, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>HCl)을 신장이 완전히 창백해질 때까지 관류한 다음 신장을 적출하였다. 적출한 신장은 섬유 피막을 벗기고 중량을 측정한 다음, 단백량, NOS 활성, eNOS mRNA 발현 정도를 검색할 때까지 진소 탱크에 보관하였다.

#### 라. 신기능의 측정

사구체여파율과 효과적 신혈류량 변화의 측정은 Nagata 등<sup>15</sup>과 Provoost 등<sup>16</sup>의 방법을 이용하였다. rhIGF-I의 투여 3일째에 약하게 애테르 마취하고 생후 30일 실험군에서는 꼬리 정맥에 <sup>99m</sup>Tc-DTPA (Dupont Co., MA, U.S.A.)와 <sup>131</sup>I-hippurate (한국에너지연구소)를 약 15초간에 걸쳐 주사하였다. 생후 7일, 14일 실험군의 흰쥐는 복강속으로 주사하였다. 주사된 동위원소 양은 주사 전, 후의 주사기 무게의 차이로써 측정하였다. 동위원소 주사 1시간 후 다시 애테르 마취하고 600μl 정맥 채혈하여 혈장 분리 후 γ-counter (Cobra 5005, Packard, U.S.A.)로 혈장내 방사성 활성도를 측정하였다. 생후 7일, 14일 실험군의 흰쥐는 남은 신장의 제거시 하대정맥 혹은 심장에서 채혈하였다. 측정 공식은 다음과 같다.

$$C = (V/t) \times \log_e(P_0/P_t)$$

여기에서 <sup>99m</sup>Tc-DTPA의 C (clearance)는 사구체여파율 (GFR)이며, <sup>131</sup>I-hippurate의 C는 효과적 신혈류량 (ERPF, ml/min)이다. P<sub>0</sub>(cpm/ml)는 동위원소 주사 후

한 시간의 혈장내 방사성 활성도이고, P<sub>t</sub>(cpm/ml)는 t(cpm)/V(ml)로 계산되고 I는 주사된 동위원소의 방사성 활성도이다. V는 각 동위원소의 분배 용적으로서 각 개체의 체중 (BW)을 이용하여 다음 공식으로 계산하였다.

$$V(^{99m}\text{Tc-DTPA}) = 0.264 \text{ BW} - 1.92 \times 10^{-4} \text{ BW}^2 + 1.03$$

$$V(^{131}\text{I-hippurate}) = 0.439 \text{ BW} - 6.17 \times 10^{-4} \text{ BW}^2 - 1.19$$

#### 마. 신장 조직의 NOS 활성과 단백량의 측정

신장의 NOS 활성의 측정은 <sup>14</sup>C-L-arginine의 효소 반응물질인 <sup>14</sup>C-L-citrulline을 측정하는 방사변역 측정법을 이용하였다. 진소 탱크에 보관된 각 군의 신장 조직을 homogenate buffer (pH 7.4, 0.32M sucrose, 20mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid, 0.5mM EDTA, 1mM dithreitol, 5mg phenyl selenyl fluoride)로 균질화하였다. 균질액에 0.45mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM NADPH (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)와 <sup>14</sup>C-L-arginine (20nCi/ml) (Amersham Life Science, Rochester, NY, U.S.A.)을 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시키며 소량의 ice-cold Hepes/EDTA buffer (20mM/2mM, pH 6)로 반응을 정지시켰다. 최종 반응액을 cation-exchange column (Dowex AG 50X-8, Na form; Bio-Rad Lab., CA, U.S.A.)에 적용시켜 <sup>14</sup>C-L-arginine으로부터 <sup>14</sup>C-L-citrulline을 분리 후, 분리된 NO의 부산물인 <sup>14</sup>C-L-citrulline의 방사성 활성도를 β-counter (Beckman S5000TA Liquid Scintillation System, Fullerton, CA, U.S.A.)로 측정하여 NO 생성능을 평가하였다. NOS 활성은 전환된 <sup>14</sup>C-L-citrulline의 방사성 활성도를 반응액에 첨가한 <sup>14</sup>C-L-arginine의 총 활성도로 나눈 % 전환율로 표시하였다 (% conversion/mg protein). 각 균질액의 단백질 성량은 Lowry 법으로 측정하였다.

#### 바. 신장 조직의 eNOS mRNA 발현 분석

신장 조직내의 NOS mRNA의 발현 분석은 신장 혈류역동학적인 변화에 직접적으로 영향을 미치는 eNOS mRNA를 측정하였으며, 각 군간의 eNOS mRNA의 발현 정도를 비교 분석을 위해 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하였다.

##### (1) 신장 조직으로부터 total RNA 분리

신장 조직으로부터 total RNA 분리는 Catrimox-14 RNA isolation Kit RIK 2.11 (TaKaRa, Japan)을 이용하였다. 먼저 동결 건조된 각 군의 신장 조직 100mg을 유발기에 넣고 액체 질소를 첨가해서 잘게 간 후, 실험 직전에 -10°C로 냠리 얼린 catrimox-14 용액에 넣고 실온에서 30분 정도 보관한 후 3,000g에서 3분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 다시 4°C에서 12,000g으로 5분 동안 원심분리하여 침전에 DEPC (Diethylpyrocarbonate) 처리수 1ml를 넣어 고르게 섞은 후

4°C, 12,000g으로 5분 동안 원심분리하였다. 침전물에 Guanidinium 용액과 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 혼합용액을 각각 0.5ml씩 넣어 고르게 섞은 후 원심분리하여 얻은 수중에 동량의 Isopropylalcohol을 넣고 -20°C에 30분 정도 보관한 후 원심분리하여 phenol이 완전히 제거된 침전을 70% ethanol로 세척하고 DEPC 처리수 20μl로 녹여 cDNA 합성을 이용하였다.

(2) 분리된 RNA를 이용한 cDNA 합성 및 cDNA를 이용한 PCR

얻어진 RNA를 이용한 cDNA 합성을 위한 반응 혼합액은 최종량을 20μl로 하여 2μl의 10xRNA buffer [100mM Tris-Cl, 500mM KCl (pH 8.3)]에 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP mixture, 20Unit RNase Inhibitor, 5Unit Avian Myeloblastosis Virus 유래의 reverse transcriptase, 2.5mM의 random primer와 DEPC 처리수를 넣고 42°C에서 1시간 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 이 반응액에 80μl의 PCR 반응 혼합액을 넣어 PCR 반응을 진행하였다. PCR 반응 혼합액 80μl는 8μl 10xRNA buffer [100mM Tris-Cl, 500mM KCl (pH 8.3)], 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5Unit Taq polymerase와 0.2μM의 eNOS specific sense primer, anti-sense primer를 각각 넣고 멀균 증류수로 최종량을 맞추어 조제하였다. PCR 반응은 먼저 94°C에서 1분 동안 반응시켜 남아있는 reverse transcriptase를 변성시킨 후, 94°C에서 45초, 50°C에서 45초, 72°C에서 1분 25초의 조건으로 denaturation, annealing, extension를 실시하였고 이를 35회 반복하여 실시한 후, 72°C에서 5분 동안 최종 연장반응을 실시하였다.

이때 이용한 eNOS specific primer와 control로 이용된 β-actin specific primer의 염기서열은 다음과 같았다 (TaKaRa Shuzo Co. LTD, Biomedical Group, Japan).

Specific primer	Sense	Anti-Sense	Reference
eNOS	TACGGACCAG-CAAATCCAC (19mer)	CAGGCTGCAG-TCCTTGATC (20mer)	Ujlie 등 <sup>17</sup>
β-actin	GGAATTCCCCA-ACTGGGACGA-CATGG	CGGGATCCTG-GCGTGGAGGGA-GAGCA	

(3) RT-PCR 산물의 확인 및 분석

최종 연장반응으로 얻어진 PCR 산물 각각 10μl와 6xloading buffer 2μl를 섞어 0.8% Sekem GTG Agarose gel에 loading하여 80V에서 40분 동안 전기영동을 실시하였고, 이때 이용된 molecular weight marker

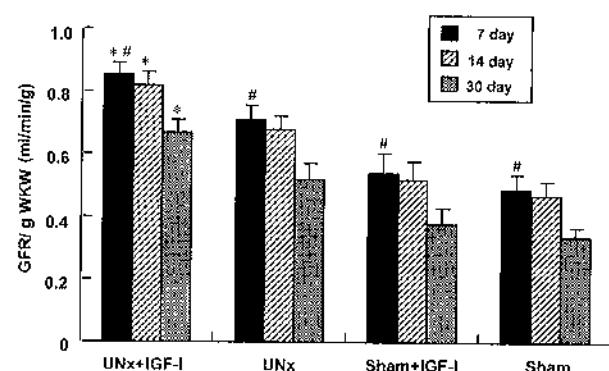


Fig. 1. GFR/g wet kidney weight (WKW) after unilateral nephrectomy and/or IGF-I treatment.

The GFR was significantly increased after the administration of IGF-I in the unilaterally nephrectomized group. A significant difference in GFR was observed in all of the 30 day groups regardless of the experimental method. Values are represented as mean  $\pm$  SEM.

UNx+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after unilateral nephrectomy. UNx: unilateral nephrectomy. Sham+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after a sham operation. Sham: sham operation. \*p<0.05: compared with UNx group. \*p<0.05: compared with 30 day group.

는 100bp DNA ladder (Promega, U.S.A.)를 사용하였다. 전기영동장치는 Mupid-21 (Cosmo Bio. Co. LTD, Japan)을 이용하였으며 eNOS는 819bp에서 증폭된 띠를 확인하였고, 각 띠의 밀도 측정은 영상분석프로그램 (TINA ver 2.10, Germany)을 이용하였다.

#### 사. 통계학적 분석

결과는 개인용 컴퓨터의 SAS 프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 구하였으며, 각 군간의 측정 값의 비교는 Two-way analysis of variance를 이용하였고, 그 후 각 시기별, 실험 방법에 따른 비교는 다중비교 분석법인 Tukey 법으로 검정하여 p<0.05 일 때 의의 있는 것으로 판정하였다.

#### 결과

##### 1. 외인성 rhIGF-I 투여가 신기능의 변화에 미치는 영향

실험 방법에 따른 단위 습중량당 사구체여과율 및 효과적 신혈류량은 실험 시기 (생후 7일, 14일, 30일)에 관계없이 한쪽 신절제 후 IGF-I를 투여한 군이 IGF-I를 투여하지 않은 군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05). Sham operation 후 IGF-I를 투여한 군 또한 IGF-I를 투여하지 않은 군에 비해 단위 습중량당 사구체여과율 및 효과적 신혈류량이 높았으나 통계학

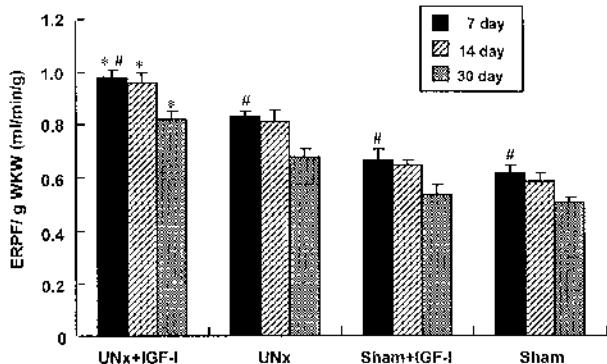


Fig. 2. ERPF/g wet kidney weight (WKW) after unilateral nephrectomy and/or IGF-I treatment.

The ERPF was significantly increased after the administration of IGF-I in the unilaterally nephrectomized group. A significant difference in ERPF was observed in all of the 30 day groups regardless of the experimental method. Values are represented as mean  $\pm$  SEM.

UNx+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after unilateral nephrectomy. UNx: unilateral nephrectomy. Sham+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after a sham operation. Sham: sham operation. \*p<0.05: compared with UNx group. #p<0.05: compared with 30 day group.

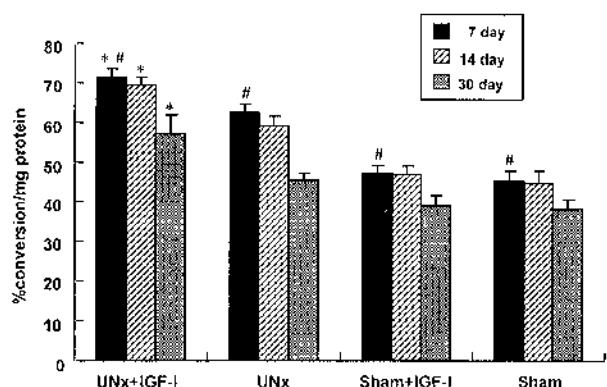


Fig. 3. Activity of Nitric Oxide Synthase enzyme after unilateral nephrectomy and/or IGF-I treatment.

The NOS activity was determined by <sup>14</sup>C-labeled L-arginine/citrulline conversion and protein assay. The NOS activity was expressed per gram of tissue (% conversion/mg protein). The activity was significantly increased after the administration of IGF-I in the unilaterally nephrectomized group. A significant difference in NOS activity was observed in all of the 30 day groups regardless of the experimental method. Values are represented as mean  $\pm$  SEM.

UNx+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after unilateral nephrectomy. UNx: unilateral nephrectomy. Sham+IGF-I: rhIGF-I was administered for 3 days after a sham operation. Sham: sham operation. \*p<0.05: compared with UNx group. #p<0.05: compared with 30 day group.

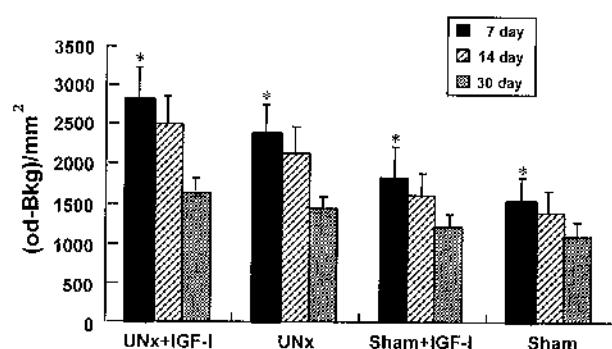
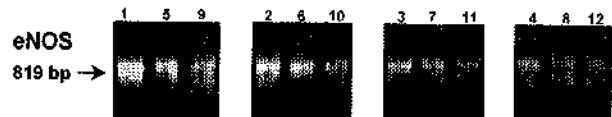


Fig. 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction of endothelial NOS mRNA of rat kidney after unilateral nephrectomy and/or IGF-I treatment.

ToP: RT-PCR of endothelial NOS mRNA of the rat kidney in each group. An eNOS band at 819bp was detected in each group. Bottom: Densitometric analysis of the top eNOS 819bp band. Mean and SEM of densitometric values are expressed as (od-Bkg)/mm<sup>2</sup>. M: standard molecular marker, 1 – 4: 7 day group, 5 – 8: 14 day group, 9 – 12 : 30 day group, 1, 5, 9: UNx+IGF-I, 2, 6, 10: UNx, 3, 7, 11: Sham+IGF-I, 4, 8, 12: Sham

\*p<0.05: compared with 30 day group.

적인 유의성은 없었다. 각 시기별 실험군간의 단위 습중량당 사구체여과율 및 효과적 신혈류량은 실험 방법에 관계없이 생후 7일 실험군에서 가장 높았으며, 생후 7일 실험군은 14일 실험군과는 통계학적인 차이는 없었으나, 생후 30일 실험군과는 유의한 차이가 있었다 (Fig. 1, 2, p<0.05).

## 2. 외인성 rhIGF-I 투여가 신장 조직의 NOS 활성에 미치는 영향

실험 방법에 따른 신장 조직의 NOS 활성은 실험 시기에 관계없이 한쪽 신절제 후 IGF-I를 투여한 군이 IGF-I를 투여하지 않은 군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05). Sham operation 후 IGF-I를 투여한 군 또한 IGF-I를 투여하지 않은 군에 비해 신장 조직의 NOS 활성이 높은 경향을 보였다. 각 시기별 실험군 간의 신장 조직의 NOS 활성의 변화는 실험 방법에 관계없이 생후 7일 실험군에서 가장 높았으며, 생후 7일 실험군은 14일 실험군과는 통계학적인 차이는 없었으나, 생후 30일 실험군과는 유의한 차이가 있었다 (Fig. 3, p<0.05).

### 3. 외인성 rhIGF-I 투여가 신장 조직의 eNOS에 미치는 영향

신장 조직의 eNOS의 발현의 변화는 전기영동으로 나타난 각각의 띠 밀도를 동일 조건 하에 ( $od\text{-Bkg}/mm^2$ )로 계산하였으며,  $od$ 는 띠의 밀도를, Bkg는 배경 밀도를 의미하며, 이를 비교한 결과 각 실험 방법별 실험군간의 신장 조직에서의 eNOS의 발현은 생후 7일, 14일, 30일 실험군 모두 한쪽 신질제 후 IGF-I을 투여한 군에서 가장 높게 나타났으며, 각 시기별 실험군간의 신장 조직에서의 eNOS의 발현은 실험 방법에 관계없이 생후 7일 실험군에서 가장 높았으며, 생후 7일 실험군은 14일 실험군과는 통계학적인 차이는 없었으나, 생후 30일 실험군과는 유의한 차이가 있었다 (Fig. 4,  $p<0.05$ ).

## 고 찰

보상성신비대는 상당 부분의 신장 기능이 소실되었을 때 나머지 신장 조직에서 소실된 신장 기능을 보상해 주는 생리적인 현상으로서, 신장이 성장할 때까지는 주로 세포 증식이, 신장이 성장한 이후에는 신장 세포의 비대가 주로 이루어진다. 그러나 다른 조직과 마찬가지로 정상보다 많은 일을 하였을 경우 개개 세포로 이루어진 조직은 과부하에 의해 폐로 현상이 일어나 결국에는 비가역적인 기능 저하 현상에 이르게 되는데, 신장에서 이 과정의 마지막 단계는 사구체경화가 일어나고 전자 신기능의 악화가 진행하여 만성 신부전증으로 나타나게 된다. 다른 한편으로 태아기에 한쪽 신장이 퇴화하여 선천적으로 신장이 하나밖에 없는 경우에 그 신장은 신장 세포의 수와 기능에서 두개의 신장을 가지고 있는 경우와 다름 없고 사구체경화의 발생이 일어나지 않을 것으로 알려져 있다. 이는 신장의 발생 과정에서 나타난 보상성신비대는 조화로운 신장 세포의 증식을 원으키기 때문에 사구체경화가 동반되지 않는 것으로 추정하고 있다. 흰쥐를 이용한 연구에 의하면 생후 14일까지는 신실질 소실 후 신장 세포의 증식 현상이, 생후 3주에서 40일까지는 증식과 비대 현상이 동시에, 성년기에서는 비대 현상만이 관찰된다.<sup>18</sup> 성년기 흰쥐와는 달리 이런 흰쥐는 보상성신비대 중에 내피세포 (endothelial cell), 혈관 간세포 (mesangial cell) 및 외피세포 (epithelial cell)가 증식 하므로<sup>19</sup> 사구체경화가 나타나지 않을 것으로 기대된다. 그러나 생후 4주에 한쪽 신장을 제거한 흰쥐는 생후 10주에 한쪽 신장을 제거한 흰쥐보다 사구체경화가 더욱 심하게 관찰되며,<sup>20</sup> 임상적으로도 소아기에 후천적인 이유로 한쪽

신장을 제거하면, 성인에서 제거한 것보다 사구체경화가 더 많이 일어난다.<sup>21</sup> 그렇다면 결국 신장의 세포비대, 세포 증식 그리고 그 시기가 신비대의 정도와 사구체경화의 정도를 결정하는 가장 중요한 요인이라고 할 수 있으며, 현재까지 정상적인 생리적 현상 속에서 사구체경화가 일어나지 않으면서 신장 기능의 보상이 나타나도록 하기 위한 연구가 지속되어 왔다. 이 연구는 보상성신비대 과정 중 발생할 수 있는 사구체경화를 예방하기 위한 연구 과정 중 일부에 해당되며, 특히 세포 증식과 세포 비대가 공존하는 신장 발육 과정 중의 흰쥐를 대상으로 보상성신비대를 유발시키고 신비대 유도물질인 rhIGF-I를 투여함으로써 신기능의 변화와 이러한 변화의 작용 기전을 알아보자 하였다.

Growth hormone (GH)은 현재까지 알려진 신기능 항진제 중에서 가장 강력하게 신기능을 항진시키는 효과를 가지고 있다. GH은 사구체여과율과 신혈류량 뿐만 아니라 근위 세관 (proximal tubule)의 재흡수까지 증가시킨다. 그러나 GH의 신장에 대한 기능 항진 작용은 GH의 직접적인 효과 이외 신장내 IGF-I의 증가를 통한 간접적 효과가 더 큰 것으로 증명되었다.<sup>14</sup> 따라서 GH이 직접 작용한나기 보다는 GH-IGF-I axis 가 신기능 항진을 유발하는 것으로 이해되고 있다. 그러나 GH-IGF-I axis에 의한 신기능 항진은 결국 사구체경화를 일으킨다는 것이 문제이다. 다행히도 기관의 기능이나 크기의 증가가 없이도 자연적으로 사구체경화만이 일어나는 마우스가 있고, 이 마우스는 일반적인 마우스와는 다른 GH-IGF-I axis를 가지고 있다는 보고<sup>22</sup>는 기관의 성장을 유도하는 기전과 사구체경화를 일으키는 기전이 서로 다르다는 것을 시사한다. GH independent IGF-I의 개념은 Stiles 등<sup>1</sup>에 의하여 처음 그 가설이 제기되었다. 이후 뇌하수체가 제거되어도 신장에서의 IGF-I 생산은 지속되며 한쪽 신장 적출시 반대측의 신장 조직에서 IGF-I의 양이 증가한다는 보고<sup>23</sup>에 의해 GH에 의존하지 않는 GH independent IGF-I이 생산된다는 것이 증명되었다. 또한 뇌하수체 제거 후 한쪽 신장을 제거한 흰쥐에서 GH independent IGF-I이 남겨진 신장의 주로 원위 곱슬 세관 (distal convoluted tubule)과 집합관 (collecting duct)에서 생산되는 것이 증명되었다.<sup>24</sup> 즉 GH이 없더라도 신장에서는 IGF-I이 생산되고 이것만으로도 생명 유지에 필요한 신장 기능이 유지되며 사구체경화는 오지 않을 수 있다. GH independent IGF-I의 존재가 밝혀진 이래, 의부에서 rhIGF-I 투여가 신장에 미치는 효과를 관찰한 많은 연구 결과들이 있었고, 이들 대부분의 연구 결과는 신장의 보상성신비대 과정 중 투여한 rhIGF-I는 사구체여과율과 신혈류량을 증가시키거나 신장의 비대를 일으킨다고 하였다.<sup>24</sup> 더욱기 사구

체여과율이 증가할 때 사구체 내압은 증가하지 않으므로<sup>25</sup> 사구체경화의 위험성도 없을 가능성을 보여주었다. 이 연구에서도 신장이 건강한 상태 및 신장 손상이 있을 때 외부에서 투여된 rhIGF-I은 사구체여과율 및 신혈류량을 증가시켰고, 특히 신장 손상이 있을 때 그 효과가 더욱 큰 것을 알 수 있었다.

신기능의 증가, 즉 사구체여과율 및 신혈류량의 증가는 신장 조직내의 Nitric oxide (NO)의 영향을 받는 것으로 많은 연구에서 밝혀져 왔다.<sup>9,12,26</sup> L-NAME 혹은 L-NMMA 등의 NOS 억제제는 신장 페질로 가는 혈류량을 감소시킬 뿐 아니라,<sup>27</sup> 신장 수질로 가는 혈류도 감소시킨다.<sup>28</sup> NOS를 억제하면 사구체 혈관에서는 수입사구체소동맥 (afferent glomerular arteriole)과 수출사구체소동맥 (efferent glomerular arteriole)의 저항이 증가되어 사구체 내압이 증가되며,<sup>29</sup> 장기적으로 NOS를 억제하면 혈관 간세포 (mesangial cell)의 tone이 변화되어 사구체의 여과율이 감소한다.<sup>30</sup> 이상의 연구 결과들은 수출사구체소동맥에 관한 부분을 제외하고는 대체적으로 일치되는 것이므로, NO가 신피질과 수질의 혈류를 증가시키고 사구체 내압을 감소시켜 사구체의 여과율이 증가되는 것으로 생각할 수 있다. 수출사구체소동맥에 대한 NO의 역할은 사구체 내압의 변화와 관련이 있고 이는 바로 사구체 경화와 관련되는 중요한 부분이다. 그러나 수출사구체소동맥에 대한 NO의 역할은 아직까지 논란이 많아서 NO는 수출사구체소동맥에 변화를 주지 않는다는 견파<sup>31</sup>와 동맥을 수축시킨다는 견파,<sup>32</sup> 그리고 동맥을 확장시킨다는 견파<sup>33</sup> 등으로 보고되고 있다. 또한 NO는 신장 세관의 기능에도 중요한 역할을 하여 근위 세관 (proximal tubule)과 침합관 (collecting duct)의 세흡수를 조절하여 sodium 배설과 요방에 영향을 미친다고 알려져 있다.<sup>34</sup> 또한 성장기 신장에서도 신손상 후 정상적인 생리적 신기능 유지를 위해 NO가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>35</sup> 이러한 결과들을 종합해 보면 보상성신비대 과정 중 신기능 증가에 NO가 중요한 역할을 하고 있다는 것으로 생각할 수 있다. 이 연구에서 실험 시기에 관계없이 한쪽 신장 제거 후 rhIGF-I 투여군 및 한쪽 신장 제거군은 sham operation 군에 비하여 신장 조직에서의 NOS 활성도가 유의하게 증가되어 있어 신기능의 변화와 연관되어 고려해볼 때 사구체의 혈류량과 여과율의 증가에 NO가 중요한 역할을 하리라 생각해 볼 수 있다.

또한 신혈류량 및 사구체여과율의 변화가 사구체소동맥의 내피세포에 주로 존재하는 eNOS에 의해 영향을 받는다는 보고가 있다. 혈관 수축을 시키는 lipopolysaccharide를 투여했을 경우 신장에서 사구체여과율이 감소하며 이는 eNOS의 억제에 기인한 것이며,<sup>10</sup> L-arginine을 투여한 경우 신혈류량이 급격히 증가하

며 신장 조직에서 inducible NOS mRNA의 증가는 없으나 eNOS mRNA의 양이 상당히 증가되어 신혈류량 및 사구체여과율의 변화에 eNOS가 주도적으로 관여하는 것으로 보고되고 있다.<sup>36</sup> 이 연구에서 신장 조직에서의 eNOS의 발현 정도가 보상성신비대 과정 중에 증가되고, 특히 rhIGF-I 투여 후에는 더욱 증가함을 관찰할 수 있었으며, 신장 세포 증식이 진행되고 있는 신생기 흰쥐의 보상성신비대 과정에서도 NO가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 흰쥐에서 세포 증식기와 증식기 이후에 외부에서 투여된 rhIGF-I은 효과적 신혈류량 및 사구체여과율을 증가시킴으로써 신기능 항진을 유발하는데, 이는 혈관 이완을 일으키는 중간 매개 물질인 NO의 생성 증가에 의한 것으로 생각된다. 그리고 신생기 혹은 유아기 흰쥐의 신손상 후 신기능 항진에 더 효과가 있어 이 시기에 신손상 후 rhIGF-I 투여는 신기능 항진에 많은 도움이 되리라 생각된다.

## 결  론

흰쥐에서 세포 증식기와 증식기 이후에 외부에서 투여된 rhIGF-I은 효과적 신혈류량 및 사구체여과율을 증가시킴으로써 신기능 항진을 유발하며, 이는 혈관 이완을 일으키는 중간 매개 물질인 NO의 생성 증가에 의한 것으로 생각된다. 그리고 신생기 혹은 유아기 흰쥐의 신손상 후 신기능 항진에 더 효과가 있어 이 시기에 신손상 후 rhIGF-I 투여는 신기능 항진에 많은 도움이 되리라 생각된다.

## REFERENCES

- Stiles AD, Sosenko IRS, D'ercole AJ, Smith BT. Relation of kidney tissue somatomedin-C/insulin-like growth factor I to postnephrectomy renal growth in the rat. Endocrinology 1985; 117: 2397-410.
- Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 4889-93.
- Matejka GL, Jennische E. Local infusion of IGF-I into the kidney of pituitary intact rats induces renal growth. Acta Physiol Scand 1992; 145: 7-18.
- Hirschberg R. Effects of growth hormone and IGF-I on glomerular ultrafiltration in growth hormone-deficient rats. Regul Pept 1993; 48: 241-50.

5. Miller SB, Hansen VA, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11876-80.
6. Franklin SC, Moulton M, Sicard GA, Hammerman MR, Miller SB. Insulin-like growth factor I preserves renal function postoperatively. *Am J Physiol* 1997; 272: F257-9.
7. Hammerman MR, Miller SB. The growth hormone-insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am J Physiol* 1993; 265: F1-14.
8. O'Shea MH, Miller SB, Hammerman MR. Effects of IGF-I on renal function in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol* 1993; 264: F917-22.
9. Haynes WG, Hand MF, Dockrell ME, Eadington DW, Lee MR, Hussein Z, et al. Physiological role of nitric oxide in regulation of renal function in humans. *Am J Physiol* 1997; 272: F364-71.
10. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, et al. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 439-48.
11. Kaufman JM, Hardy R, Hayslett JP. Age-dependent characteristics of compensatory renal growth. *Kidney Int* 1975; 8: 21-6.
12. Ballevre L, Thonney M, Guignard JP. Nitric oxide modulates glomerular filtration and renal blood flow of the newborn rabbit. *Biol Neonate* 1996; 69: 389-98.
13. 나군호, 한상원, 최승강. 신생 흰쥐의 보상성신비대 과정 중 시기별 신장세포의 증식과 세포분열의 변화 및 신장 Nitric Oxide Synthase 활성의 변화. *대한비뇨기과학회지* 1996; 37: 1319-26.
14. Hirschberg R, Kopple JD. Evidence that insulin-like growth factor I increase renal plasma flow and glomerular filtration rate in fasted rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 326-30.
15. Nagata M, Scharer K, Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. I. hypertrophy and distortion of capillary architecture. *Kidney Int* 1992; 42: 136-47.
16. Provoost AP, DeKeijzer MH, Wolff ED, Molenaar JC. Development of renal function in the rat. *Renal Physiol* 1983; 6: 1-9.
17. Ujie 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: F296-302.
18. Winick M, Noble A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Devel Biol* 1965; 12: 451-66.
19. Olivetti G, Anversa P, Rigamonti W, Vitali-Mazza L, Loud AV. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy: A light microscopoe study. *J Cell Biol* 1977; 75: 573-85.
20. Okuda S, Motomura K, Onoyama K, Fujishima M. High incidence of glomerular sclerosis in rats subjected to uninephrectomy at young age. *Nephron* 1988; 49: 240-4.
21. Argueso LR, Ritchey ML, Boyle ET, Milliner DS, Bergstrahl EJ, Kramer SA. Prognosis of children with solitary kidney after unilateral nephrectomy. *J Urol* 1992; 148: 747-51.
22. Yang CW, Striker LJ, Pesce C, Chen WY, Peten EP, Elliot S, et al. Glomerulosclerosis and body growth are mediated by different portions of bovine growth hormone. *Lab Invest* 1993; 68: 62-70.
23. Lajara R, Rotwein P, Bortz JD, Hansen VA, Sadow JL, Betts CR, et al. Dual regulation of insulin-like growth factor I expression during renal hypertrophy. *Am J Physiol* 1989; 257: F252-61.
24. 한상원, 최학룡, 최승강. 성장호르몬 비의존성 신장 Insulin-like Growth Factor-I의 존재. *대한비뇨기과학회지* 1995; 36: 341-8.
25. Hirschberg R, Kopple JD. The growth hormone-insulin-like growth factor I axis and renal glomerular function. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1417-22.
26. Gonzales JD, Llinas MT, Nava E, Chiadoni L, Salazar FJ. Role of nitric oxide and prostaglandins in the long-term control of renal function. *Hypertension* 1998; 32: 33-8.
27. Reckelhoff JF. Age-related changes in renal hemodynamics in female rats: role of multiple pregnancy and NO. *Am J Physiol* 1997; 272: R1985-9.
28. Alberola A, Pinilla JM, Quesada T, Romer JC, Salom MG, Salarzar FJ. Role of nitric oxide in mediating renal response to volume expansion. *Hypertension* 1992; 19: 780-4.
29. Zatz R, de Nucci G. Effects of acute nitric oxide inhibition on glomerular microcirculation. *Am J Physiol* 1991; 261: F360-3.
30. Baylis C, Mitraka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992;

- 90: 278-81.
31. Deng A, Baylis C. Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient. *Am J Physiol* 1993; 264: F212-5.
  32. Ito S, Johnson CS, Carretero OA. Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 1991; 87: 1656-63.
  33. Hoffend J, Cavarape A, Endlich K, Steinhausen M. Influence of endothelium-derived relaxing factor on renal microvessels and pressure-dependent vasodilatation. *Am J Physiol* 1993; 265: F285-92.
  34. Majid DSA, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1993; 33: F79-87.
  35. Solhaug MJ, Ballevre LD, Guignard JP, Granger JP, Adelman RD. Nitric oxide in the developing kidney. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 529-39.
  36. Bosch-Marce M, Morales-Ruiz M, Jimenes W, Bordas N, Sole M, Ros J, et al. Increased renal expression of nitric oxide synthase type III in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1998; 27: 1191-9.