

고혈압백서의 신장 Renin Heterogeneity에 관하여

전북대학교 의과대학 생리학교실

전창렬 · 최병수 · 김선희 · 조경우

(1988년 10월 16일 접수)

== Abstracts ==

Heterogeneity of Renin Released from Renal Cortical Slices

Chang Yeal Jeon, Byung Soo Choi, Sunn Hee Kim and Kyung Woo Cho

*Department of Physiology, Jeonbuk National University Medical School
2-20 Keum-Am-Dong-San Jeonju 560-180, Korea*

It has been well known that the renal cortical blood flow rate was much higher than that of the medulla and the renal blood flow distribution was affected by hemorrhage, volume expansion or salt-loading. The existence of the heterogeneities of glomerular filtration rate and nephron has also been reported. In order to understand the regulations and physiological roles of the heterogeneities, studies on the intrarenal renin-angiotensin system have been focused. Although it is well known that the granularity of juxtaglomerular cells and renal renin content are more marked in superficial than in the deep glomeruli, their physiological significance is not quite clear. This study was therefore undertaken to clarify changes in renin response and isoelectric renin profile to TMB-8 in outer, mid and inner cortices of normotensive and hypertensive rats.

The basal rate of renin release was highest in outer cortex of Sprague-Dawley rat (SDR), Wistar rat (WR) and spontaneously hypertensive rat (SHR). The basal renin release from outer and inner cortex of SHR was significantly lower than that from those of SDR. The response of renin release to TMB-8 was highest in mid cortex and the increase of renin release in response to TMB-8 from inner cortex of SDR was significantly higher than that in SHR. In dehydrated rats, the basal renin release from renal cortical slices of SDR was increased but that from WR and SHR was not.

The response of renin release to TMB-8 from mid and inner cortex of dehydrated WR tended to increase. In dehydrated SHR, increase of renin release from inner cortex was significantly higher than that in euhydrated SHR. No significant differences in the isoelectric renin profile were found both in different cortical areas and strains. In dehydrated rats, the percentage of renin form 2 was decreased and those of renin form 5 and 6 were increased.

These results suggest that the heterogeneity of renin release from cortical area of euhydrated and dehydrated rats in response to TMB-8 may be related to the changes of renal blood flow and/or calcium metabolism in cortical area. These data also suggest that the renin forms with different isoelectric points may have an physiological significance.

Key Words: Renin, Renal cortex, Calcium antagonist, Isoelectric focusing, Spontaneously hypertensive rat.

서 론

일찌기 Truetae등(1947)은 가토신장에 throtrast를 주입하여 신장부위에 따른 신혈류량을 측정하고 피질혈류는 수질혈류보다 많다고 보고하였으며, 그 후 혈류측정 방법의 발전으로 신장의 부위에 따른 혈류량의 측정이 보다 용이하게 됨으로 신혈류량의 heterogeneity에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 즉, "microsphere technique"을 이용한 연구에서 신장조직의 무게당 사구체의 혈류량은 피질의 외층에서 내층으로 갈수록 감소된다고 하였고(Barratt et al, 1973; Katz et al., 1971; McNay & Abe, 1970; Slotkoff et al., 1971; Stein et al., 1971), 이와 같은 혈류구배는 출혈성저혈압(Stein et al., 1973; Kirkebo & Tysseboth, 1974), 또는 식염수의 주입(Barratt et al., 1973; Jamison & Lacy, 1971)으로 인한 세포외액의 변화나 저식염섭취(Steiner et al., 1979)와 같은 전해질섭취량의 변화에 의해서도 쉽게 변할 수 있다고 하였다.

최근, 백서신장피질의 사구체수출세동맥(cortical eferent arteriole)에 미세천자를 시행하여 얻은 자료에서의 단백질농도의 다양성은 사구체여과율의 heterogeneity를 암시하고 있으며(Jensen et al., 1984; Jackson & Oken, 1982), 이와 같은 사실의 발생기전을 구명하기 위해서 "renin-angiotensin계"에 관한 연구가 활발히 이루어 졌다. "Juxtaglomerular apparatus"의 과립성과 renin 함량은 신장부위에 따라 상이하며(Farup, 1971), 고염섭취(Garvas et al., 1970; Brown et al., 1965)나 수술조작에 의해서도 영향을 받는다고 하였다. 신장의 부위에 따른 renin 함량의 구배에 대해서는 가토(Garvas et al., 1970; Brown et al., 1965), 개(Horinchi., 1971) 및 백서(De Rouffignac et al., 1974)에서 보고된 바 있고, 고염섭취시는 사구체당 renin 함량은 감소되나 피질내의 renin 함량은 변화되지 않고(De Rouffignac et al., 1974), 포재성 nephron에 높다고 하였다(Garvas et al., 1970). 신장내 renin 구배는 "single-nephron GFR (SNGFR)"의 "heterogeneity"와 관련이 있다고 하나(Horster & Thurau, 1968; De Rouffignac et al., 1972) 이 renin 구배의 생리적 의의는

분명치 않다.

Angiotensin I 변환효소에 의하여 신장에서 형성된 내재성 angiotensin II는 백서의 사구체 수출세동맥에 직접 작용하여 수축시킴으로 신혈류량 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나(Frega et al., 1978), Rurghardt등(1982)은 포재성 사구체와 심재성 사구체 사이에는 Angiotensin I 변환효소의 활성도에 차이가 없으며, 아마도 renin이 angiotensin II를 형성하는 제한인자일 것이라고 보고하였다.

최근, Seul (1967)은 renin 분비촉진제인 L-isoproterenol, 3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethyl-amino) octyl ester (TMB-8), 및 renin 분비 억제제인 angiotensin II에 의한 백서신장의 피질 각층에서 renin 분비 반응성에 차이가 있음을 보고한 바 있다. 그러나 신장부위에 따른 약물반응성이 고혈압백서인 "spontaneously hypertensive rat (SHR)"에서 어떠한 차이가 있는지는 알려진 바 없다.

Active renin은 등전점에 따라 4~6개의 renin 종류가 있으며, 사람, 돼지, 가토(Druillet & Overturff, 1981), 개(Shier & Malvin, 1985) 및 백서(Katz & Malvin, 1984)의 신장에 존재한다고 알려졌다. 등전점에 의하여 분류된 renin의 이러한 profile은 저염섭취백서(Katz & Malvin, 1984), Goldblatt 고혈압백서(Sessler & Malvin, 1985) 및 stroke-prone SHR (Sessler et al., 1985)에서 변화하며, isoproterenol(Katz & Malvin, 1982)이나 verapamil (Sessler et al., 1986)에 의하여 자극된 신장 절편에서도 변화함이 알려졌다. Sessler등(1986)은 renin 분비자극에 의하여 반감기가 긴 acidic renin 쪽으로 renin profile이 이동하는 것은 혈장 renin의 농도를 증가시키려는 효소합성의 경제적인 적응일 것이라고 암시한 바 있다. 신장내 renin의 함량은 부위에 따라 현저한 차이를 나타내는 데, 이러한 renin 함량의 차이와 더불어 renin profile이 부위에 따라 어떠한 변화가 있는 지는 아직 알려진 바 없다.

저자는 이에 착안하여 정상혈압 백서인 Sprague-Dawley, Wistar계 백서와 자연발생 고혈압 백서인 SHR, 그리고 탈수처리한 백서에서 신장피질의 부위에 따른 renin 유리와 TMB-8에 의한 반응성을 비교하고자 하였으며 이때의 renin의 등전점에 따라 분류되는 renin profile도 아울러 관찰하고자 하였

다.

실 험 방 법

1. 실험동물

실험동물은 동계교배하여 사육한 체중 150~200 g 내외의 정상혈압백서인 Sprague-Dawley rat (SDR), Wistar rat (WR)와 자연발생 고혈압 백서인 spontaneously hypertensive rat (SHR)로 물과 사료를 충분히 주어 자연채광 상태에서 사육하였다.

탈수로 신장부위에 따른 renin 분비 반응성의 변화를 보기위한 실험에서는 3일간 물을 주지 않았으며, 다른 조건은 대조군과 동일하게 하였다.

2. 신장절편에서 Renin 분비효과를 보기 위한 실험

실험에 사용한 백서는 guillotine으로 단두시킨 후 빠른 시간내에 양측 신장을 적출하였다. 신피질을 제거한 후 신장을 장축으로 3등분하여 상단부와 하단부의 1/3씩은 버리고 중심부 1/3을 취하여 다시 장축으로 3등분 하였다. 이들 각 신장부위에서 수질이 포함되지 않은 양측은 버리고 중앙부위만을 취한 뒤 arcuate artery를 기준으로 하여 외측의 피질부위만을 취하였다. 이 피질부위 절편을 Stadie-Riggs microtome위에 놓고 피막쪽에서 수질부위쪽으로 약 0.3 mm 두께로 slicing하였다. 제일 외측절편은 버리고 다음 한장은 버리고 두장의 절편을 중층(midcortex, MC)의 신장절편으로 취하였다. 다시 한장의 절편을 버린 후 다음 2장의 절편을 내층(inner cortex, IC)의 절편으로 취하였다. 피질부위 절편들로부터의 OC, MC, IC 절편들을 각각 모아서 산소-탄산가스 혼합가스(95%~5%)하의 37°C "physiologic salt solution"에서 incubation하였다.

Physiologic salt solution의 조성(mM)은 NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂ 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄ · 7H₂O, 1.2; NaHCO₃, 25; glucose 10.0 이었다. Incubation 용액의 osmolarity는 300 mOsm/kg H₂O이었으며, pH 7.4이었다.

신장절편은 10분간 incubation 후 약 10 mg씩을 2.5 ml의 incubation 용액이 들어있는 siliconized vial에 분리incubation하였으며, 매 실험은 triplicate로 행하

였다. 매 실험시 incubation 20분때에 incubation vial로부터 100 ul의 incubation 용액을 채취하였으며, 약물은 사용하기 직전 적당한 량으로 희석하여 사용하였다. Incubation 80분때에 1 ml의 incubation 용액을 취하여 renin의 정량과 renin profile을 보는 실험에 사용하였다. Incubation 후 신장절편은 wet weight로 무게를 측정하였다. Incubation 용액의 renin 활성도는 백서에서 얻은 renin 기질을 사용하여 측정하였다.

3. Renin profile의 변화를 보기 위한 실험

백서 조직 절편에서 medium 내로 유리된 renin의 등전점에 따라 분리된 renin heterogeneity를 보기 위해 incubation medium을 Katz등(1982)의 방법에 의한 isoelectric focusing에 사용하였다. Isoelectric focusing gel은 pH range가 다른 Ampholine (5~7, 4~6)을 1:3의 비율로 혼합한 13 cm 정도의 5% polyacrylamide gel이었으며 위와 아래의 electrode solution은 각각 0.05M L-histidine과 0.05 M L-asparagine이었다. 500 ul의 incubation medium에 4 mg histidine과 10 mg sucrose를 녹인 후, renin 활성도에 따라 100~200 ul의 시료를 가하였다. Voltage를 100에서 500 V로 서서히 1시간에 걸쳐 승압시키고, 5°C에서 20시간 동안 일정한 전압이 유지되도록 하였다. 그후, 각 gel을 꺼내어 dry ice/acetone 혼합액을 급냉각시키고 이를 3 mm 간격의 절편을 만들었으며, 각 gel 절편내의 renin은 신장적출백서에서 얻은 renin 기질 200 ul를 가해 4°C에서 12시간 동안 용출하였다.

4. Renin 활성도 측정을 위한 Radioimmunoassay

I-125 angiotensin I ((5-Ile), (tyrosyl-1 25-I)-monoiodinated: specific activity, 170 uCi/ug)을 만들기 위한 iodination은 chloramine-T-method에 의하였다. 즉, sodium phosphate buffer (pH7.4, 0.5 M) 25 ul가 들어 있는 조그만 시험관에 5 ug의 angiotensin I (human form)이 들어있는 5 ul의 용액과 sodium iodide-125 (1 mCi/10 ul, Amersham사) 10 ul를 가하였다. Iodination하기 직전에 만든 chloramine-T (3.6 mg/ml) 20 ul를 가한 후 실온에서 40초간 조습

럽게 pipette로 혼합하고, 80 ul의 sodium metabisulfate (2.4 mg/ml)를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 30% 우혈청 (bovine serum albumin, BSA) 200 ul를 넣은 후 Sephadex G-25 column에 조심스럽게 가하고 sodium phosphate buffer로 1 ml/min의 속도로 elution하였다. Elution buffer는 0.3% BSA, 0.3% lysozyme과 0.1% glycine을 함유하고 있으며, fractionation 용액을 받기 위한 시험관에는 200 KIU/ml의 aprotinin이 함유된 elution buffer, 3 ml를 가해, 높은 radioactivity에 의한 angiotensin I의 파괴를 방지하였다. 약 0.5 ml 씩 fractionation한 직후 잘 혼합하여 25 u속에서 들어 있는 radioactivity를 측정하고, iodinated angiotensin I의 peak에 해당하는 fraction은 3, 000, 000 cpm/tube가 되도록 분주하여 -20 °C에 보관하였으며, 매 시험관당 8, 000 cpm이 되도록 하여 사용하였다.

Angiotensin I의 항체는 Goodfriend등(1964)의 carbodiimide 방법을 변용한 Cho등(1987)의 방법에 따라 angiotensin I (5-Ile, 9-His)을 가토의 혈청 albumin에 결합시키고 동량의 Freund's adjuvant와 잘 섞어 6주간 주 1회씩 여러 부위에 주사하였다. 체혈은 2주후부터 하여 그 역가를 측정하였으며, 혈장은 56°C 30분 동안 비활성화 하여 사용하였다. 역가가 결정된 angiotensin I 항혈청은 사용에 편리하도록 일단계 희석하여 소량씩 나누어 -70°C에 보관하였다.

Renin 기질은 Cho 및 Malvin(1979)의 방법에 따라 만들었으며, renin 활성도의 측정을 위한 angiotensin I의 측정은 Sealey등(1973)의 방법을 변용한 Cho 및 Kim(1982), Cho등(1987)의 방법에 의하였다. Angiotensin I 변환효소 및 angiotensin I 파괴효소의 억제제로는 EDTA, phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF) 및 8-hydroxyquinoline을 사용하였다.

Angiotensin I의 radioimmunoassay는 BSA를 포함한 Tris-acetate buffer (pH 7.4, 0.1 M)을 사용하여 일반적인 방법에 따랐다. 4 °C 하에서 18~30시간 방치 후 charcoal suspension으로 bound form과 free form을 분리하였으며 gamma counter을 사용하여 radioactivity를 측정하였다.

5. 사용약물

사용한 약물중 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, BSA, rabbit serum albumin, PMSF, neomycin, Trizma, phenylmercuric acetate, maleic acid, 3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)-octyl-ester (TMB-8), asparagine, histidine, charcoal은 Sigma제, Dextran T-70은 Pharmacia제, Ampholine은 LKB제, Na-I 125는 amersham제를 사용하였다.

6. 통계 처리

실험결과의 통계처리는 Student paired t-test와 unpaired t-test에 의하였고, renin profile의 비교는 Mann-Whitney U-test에 의하였다. P-value가 0.05의 값을 보이는 경우 유의한 차이의 한계로 삼았다. 실험치의 표현은 mean±SE로 하였다.

실 험 결 과

1. 신장조직절편에서의 basal renin release

Table 1은 SDR, WR 및 SHR의 혈압, 혈장 renin 활성도 및 신피질의 외층, 중층 그리고 내층에서의 basal renin release를 나타낸 것이다. 고혈압백서인 SHR의 혈압은 정상혈압 백서인 SDR와 WR에 비해 현저히 높았으며, 혈중 renin 활성도는 현저하게 낮아 있었다(Table 1). SDR의 신장절편에서의 basal renin release는 외층, 중층, 내층에서 102.94±16.52, 39.07±9.62, 19.67±5.42 ngAI/mg/hr로 낮아지며, WR에서는 102.84±32.94, 86.79±30.48, 46.99±18.55 ngAI/mg/hr였다. 그리고 SHR에서는 50.43±20.82, 25.48±9.70, 7.51±1.34 ngAI/mg/hr로 SDR의 외층과 내층에서 유리되는 renin량에 비해 현저히 감소되어 있었다(Table 1, Fig. 1).

2. TMB-8에 의한 renin유리의 증가

SDR의 외층으로 부터 renin유리는 TMB-8, 5×10⁻⁵ M에 의해 102.94±16.52 ngAI/mg/hr에서 203.59±29.59 ngAI/mg/hr로 2.00±0.15배 증가하였으며, 중층에서는 39.07±9.62 ngAI/mg/hr에서 103.

Table 1. Blood pressure, plasma renin concentration and basal renin release of kidney slices from the outer, mid and inner cortices in Sprague-Dawley, Wistar and spontaneously hypertensive rats

	BP (mmHg)	PRC (ngAI/ml/hr)	Basal Renin Release (ngAI/mg of wet weight/h)		
			OC	MC	IC
SDR (n=4)	110.0±2.4	87.5±12.1	102.94±16.52	39.07± 9.62	19.67± 5.42
WR (n=5)	115.0±2.4	78.0±10.2	102.84±32.94	86.79±30.48	46.99±18.55
SHR (n=4)	155.2±4.3	32.5±2.4#*	50.43±20.82#	25.48± 9.70	7.51±1.34#

Values are the mean±SE. BP, blood pressure; PRC, plasma renin concentration; OC, MC, IC, outer, mid and inner cortices; SDR, WR, SHR, Sprague-Dawley rat, Wistar rat, spontaneously hypertensive rat. #, *, Significantly different from Sprague-Dawley or Wistar rat, respectively, p<0.05.

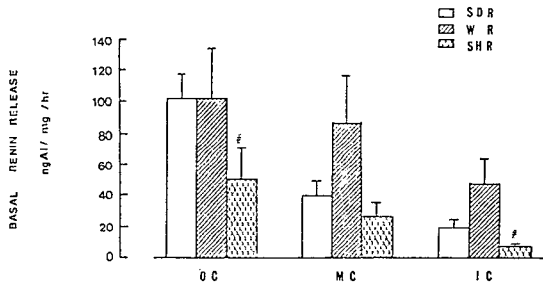


Fig. 1. Basal renin release from the outer, mid and inner cortices of Sprague-Dawley (SDR), Wistar (WR) and spontaneously hypertensive rats (SHR). OC, MC, IC, Outer, mid and inner cortex. #, Significantly different from Sprague-Dawley rat, p<0.05.

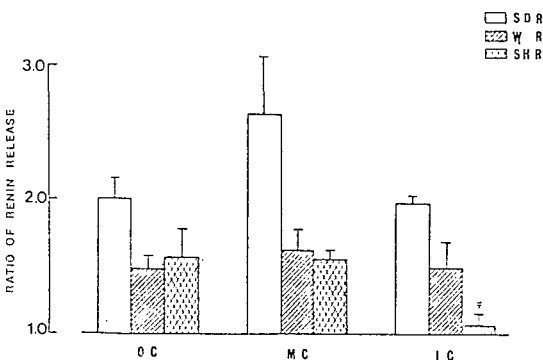


Fig. 2. Increase in renin release to TMB-8, 5×10⁻⁵ M, from the outer, mid and inner cortices of Sprague-Dawley, Wistar and spontaneously hypertensive rats. Other legends are the same as in Fig. 1.

47±21.61 ngAI/mg/hr로 2.76±0.45배, 그리고 내층에서는 19.67±5.42 ngAI/mg/hr에서 36.16±1.37 ngAI/mg/hr로 1.96±0.43배 각각 증가하였다(Fig. 2).

WR의 신장절편으로 부터 renin유리는 TMB-8에 의해 102.83±32.94에서 137.25±46.60 ngAI/mg/hr로 1.47±0.12배, 86.79±30.48에서 132.69±37.74 ngAI/mg/hr로 1.73±0.18배, 그리고 46.99±18.55에서 60.01±20.01 ngAI/mg/hr로 1.48±0.18배 각각 증가하였다. 고혈압백서인 SHR의 TMB-8에 의한 renin유리는 외층에서 50.43±20.80에서 78.90±31.77 ngAI/mg/hr로 1.62±0.24 배, 중층에서는 24.48±9.70에서 40.61±04.89 ngAI/mg/hr로 1.60±0.07배 그리고 내층에서는 7.51±1.34에서 8.69±1.91 ngAI/mg/hr로 1.14±0.19배 증가하였다. TMB-8에 의한 각 부위에 따른 renin유리의 증가는 중층이 가장 높았으며, SHR의 내층에서 그 반응성이 유의하게 약화되어 있었다(Fig. 2).

3. 탈수처리한 백서의 신장피질절편에서의 basal renin release

3일간 탈수처리한 SDR, WR 및 SHR의 혈장 renin 활성도는 170.67±35.20, 172.72±49.36, 166.40±17.80 ngAI/ml/hr로 현저히 증가하였다.

탈수처리한 SDR의 신장조직절편에서 TMP 3에 의한 renin 유리는 외층에서는 244.85±56.71에서 369.37±66.23 ngAI/mg/hr로 1.85±0.37배 증가하

였으며, 중층에서는 126.09 ± 25.44 에서 56.74 ± 9.03 ngAI/mg/hr로 1.87 ± 0.28 배 증가하였다(Fig. 3).

WR의 외층에서는 137.15 ± 29.17 에서 TMB-8에 의해 253.25 ± 83.70 ngAI/mg/hr로 1.74 ± 0.23 배 증가하였으며, 중층에서는 85.94 ± 18.66 에서 180.84 ± 31.45 ngAI/mg/hr로 2.28 ± 0.36 배 증가하였다. 내층에서는 31.86 ± 4.48 에서 63.01 ± 8.77 ngAI/mg/hr로 2.11 ± 0.30 배 증가하였다(Fig. 3).

SHR은 TMB-8에 의해 피질의층에서 30.68 ± 4.31 에서 48.04 ± 3.66 ngAI/mg/hr로 1.65 ± 0.24 배 증가하였으며, 중층에서는 22.62 ± 1.89 에서 35.87 ± 5.10 mgAI/ng/hr로 1.57 ± 0.13 배, 내층에서는 8.95 ± 3.77 에서 17.87 ± 4.90 ngAI/mg/hr로 1.99 ± 0.29 배 증가하였다(Fig. 3).

탈수처리에 의한 basal renin release는 SDR의 중층 및 내층에서만 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), WR와 SHR에서는 증가하지 않았다. 탈수처리

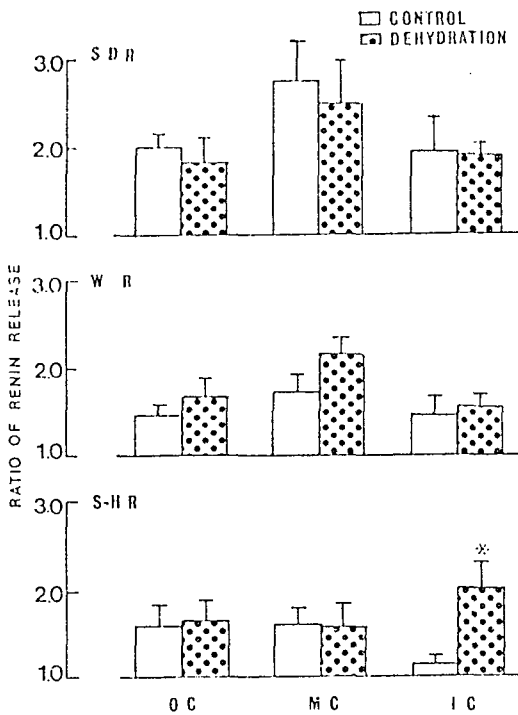


Fig. 3. Comparison of renin release in response to TMB-8 between euhydrated and dehydrated rats. *, Significantly different from euhydrated rats. Other legends are the same as in Fig. 1.

한 백서에서 TMB-8에 의한 renin유리 반응성은 SDR에서는 정상군과 차이가 없었으나 WR에서는 중층과 내층에서 강화되는 경향을 보였으며, SHR에서는 내층에서 현저히 강화된 경향을 보였다(Fig. 3).

4. 신장부위에 따른 유리 renin의 isoelectric focusing pattern

백서의 신장 renin의 isoelectric point (P_2)는 5.8, 5.6, 5.4, 5.2, 5.0 그리고 4.8이었다(Fig. 4).

SDR의 피질의층 renin profile은 2.66 ± 0.53 , 46.42 ± 3.23 , 25.14 ± 1.25 , 14.60 ± 1.37 , 7.18 ± 0.39 그리고 $4.20 \pm 0.88\%$ 였으며 중층과 내층의 renin profile도 외층과 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4). WR의 renin profile은 외층에서 4.20 ± 0.69 , 44.90 ± 3.29 , 24.07 ± 0.65 , 14.30 ± 1.28 , 8.62 ± 1.32 , $3.92 \pm 0.48\%$ 로 중층과 내층의 profile과 큰 차이를 보이지 않았다. SHR에서도 역시 신피질부위사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. TMB-8에 의한 외층의 renin 유리 증가는 SDR, WR 및 SHR에서 2.00 ± 0.15 , 1.47 ± 0.12 , 1.62 ± 0.24 배였으나, renin profile은 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

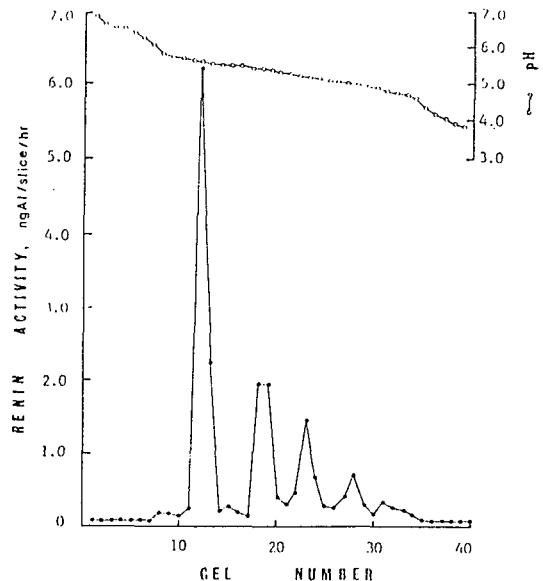


Fig. 4. Isoelectric focusing pattern of renin released from outer cortex in Sprague-Dawley rats.

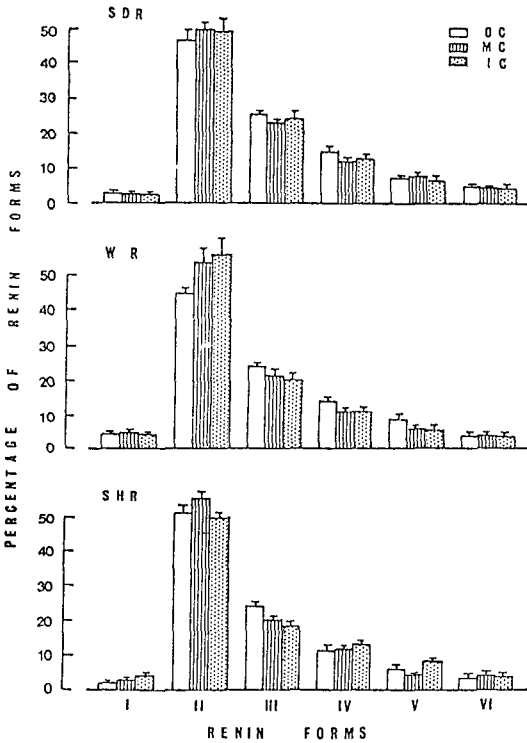


Fig. 5. Isoelectric focusing profile in the outer, mid and inner cortices of Sprague-Dawley, Wistar and spontaneously hypertensive rats. Renin forms I to VI indicate the renin peaks ordered by their isoelectric points from alkaline to acid. Other legends are the same as in Fig. 1.

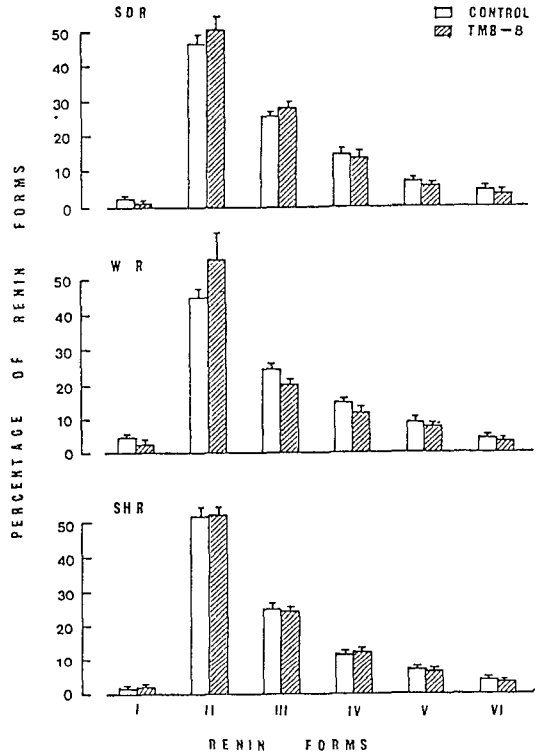


Fig. 6. Isoelectric profile of renin released from the outer cortex treated with TMB-8, 5×10^{-5} M, of Sprague-Dawley, Wistar and spontaneously hypertensive rats. Other legends are the same as in Fig. 5.

5. 탈수처리한 백서의 신피질부위에 따른 유리 renin의 isoelectric focusing pattern

탈수처리된 백서의 신피질 절편에서 유리된 renin의 profile은 SDR, WR, SHR 모두에서 renin form 2는 감소하였으며 보다 acidic한 form 4, 5, 6이 증가하거나 증가하는 경향을 보였다. 그러나 탈수된 SDR, WR, SHR 사이의 renin profile에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 7).

고 안

백서신장절편의 피질의층에서의 renin 분비율은 중층과 내층에서의 renin 분비율보다 높은 본 실험

결과는 Jones 등(1979)과 Seul(1987)의 보고와 일치하였다. 고혈압 백서인 SHR에서 신피질의 다른 부위에서의 renin 분비율에 관한 보고는 거의 없지만 외층절편에서의 renin 분비량이 중층 및 내층의 renin 분비량보다 높다는 것은 정상혈압백서인 SDR이나 WR과 유사하였으나, renin 분비량의 절대치는 현저히 낮아 있었다. 이는 SHR에서의 혈장 renin 활성도가 낮다는 본 실험결과와 RAS가 억제되었다는 보고(Shiono & Sokabe, 1976; Freeman et al., 1975)를 종합해 본다면 이해할 만 하다.

3일간 탈수처리한 백서에서 혈장 renin 활성도는 현저히 증가하여 있었으며, 혈장 renin 활성도의 증가율은 SHR에서 더욱 현저하였다. 이는 SHR에서 탈수와 출혈에 의한 혈장 renin 활성도의 증가가 SDR과 WR에서 보다 현저하다는 Choi(1986)의 보

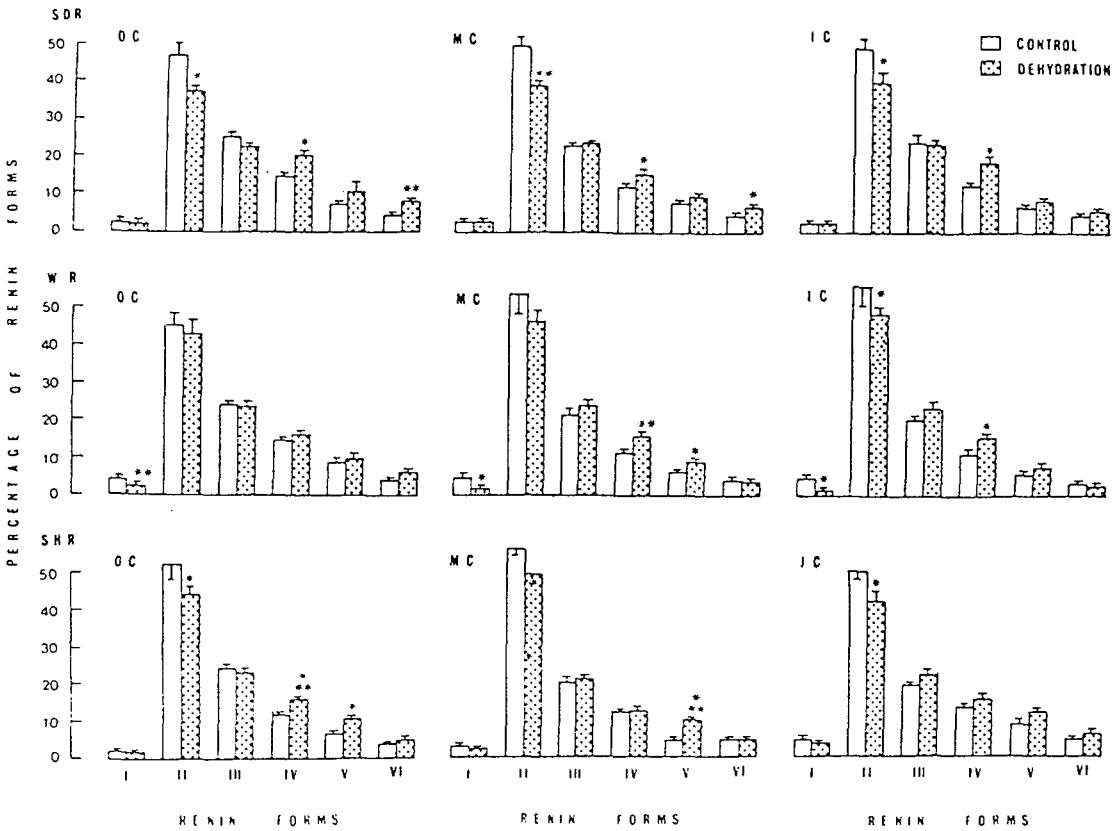


Fig. 7. Isoelectric focusing profile in the outer, mid and inner cortices of dehydrated Sprague-Dawley, Wistar and spontaneously hypertensive rats. *, Significantly different from control rats, $p < 0.05$. Other legends are the same as in Fig. 1.

고와 일치하고 있다. 그러나 신피질절편에서의 renin 분비량은 SHR에서는 유의한 변화를 보이지 않았으며, 신피질절편에서 basal renin 분비량이 변화하지 않은 것은 renin 함유량과 renin 분비량의 상관관계를 발견하지 못한 De Vito 등(1970)의 보고와 일치하였으며, 양측 부신절제에 의해서도 renin 분비량의 증가를 발견할 수 없었던 Sessler 등(1986)의 보고도 비슷하였다. 그러나 Park 등(1978)은 저농도의 renin을 함유한 개의 신피질절편과 그곳에서 분비되는 renin 량 사이에는 서로 상관관계가 있다고 보고하였으나 고농도의 renin을 함유한 신피질절편에서는 이 관계가 성립하지 않는다고 하였다. 백서의 신장내 renin 함유량은 개의 renin 함유량에 비해 5~10배 이상이나 높고 탈수와 같은 renin 분비자극에 의해 신장 renin 함유량이 증가하므로 고농도의

renin을 함유한 신장절편과 그곳에서 유리되는 renin 분비량 사이에 정비례관계를 발견할 수 있던 것으로 사료된다.

다른 호르몬과는 반대로 renin 유리는 세포내외 세포의 Ca^{2+} 의 농도증가에 의해 억제된다는 것은 잘 알려진 사실이다. Martin-Dupont 등(1984)은 사람 신장의 피질(cortical) 및 방수질사구체(juxtamedullary)를 이용한 실험에서 calcium channel inhibitor인 verapamil에 의해 단지 피질사구체혈관만이 이완된다고 보고하였다. 본 실험에서 신피질의 외층, 중층 및 내층에서 Ca^{2+} antagonist에 의한 renin 유리의 반응성을 연구하기 위해 세포내 Ca^{2+} 길항제인 TMB-8을 사용하였다. TMB-8에 의한 renin 분비의 증가는 SDR는 중층에서 컷으며 외층과 내층에서의 반응성은 유사하였으나, WR에서는

세층에서 모두 유사한 반응성을 보였다. SHR에서는 외층과 중층에서 유사한 반응성을 보였으며 내층에서는 거의 반응하지 않았다. TMB-8에 의한 renin 분비 증가의 반응성이 중층에서 가장 현저히 나타났는데, 이는 L-ISP에 대한 반응성을 관찰한 Seul(1987)의 보고와 유사하였다. Torretti등(1978)은 교감신경의 신경전달물질인 norepinephrine에 의해 고양이의 신피질의층절면에서의 renin 분비증가율이 내층의 그것보다 높다고 보고하였다. 약물에 의한 renin 분비증가의 반응성의 차이는 중층의 JG cell내에 있는 Ca^{2+} 에 의한 renin 분비조절이 외층이나 내층의 renin 분비조절과 상이하기 때문인 것이라 사료된다.

TMB-8에 의한 renin 분비의 반응성이 3일간 탈수처리한 SHR에서 내층에서만 현저히 증가되어 있었으며, 정상혈압백서인 SDR에서는 그 반응성에 차이가 없었으며 WR에서는 반응성이 약간 강화되는 경향은 보였으나 유의한 차이는 발견할 수 없었다. 세포외액의 감소를 일으키는 유사한 자극인 출혈에 의해서 신피질의 내층에서의 신혈류량의 증가를 관찰한 Stein등(1973)의 보고와 비교하면, 이러한 약물에 대한 renin 분비증가의 반응성의 변화는 확실한 기전은 알 수 없지만, 신혈류량의 재배치에 의하여 나타날 수도 있을 것이며, 특히 SHR에서는 탈수에 의한 신혈류량의 변화가 예민한 것이 아닌가 생각된다.

백서의 신장의 active renin은 6개의 등전점을 갖는 heterogeneity를 가지고, 이들은 일정한 비율로 신장에서 혈장이나 incubation medium 내로 분비가 된다고 보고되었다(Katz & Malvin, 1984; Sessler et al., 1986). Isoelectric renin profile은 저식염섭취(Katz & Malvin, 1984)나 양측부신제거(Sessler et al., 1986)와 같은 장기간의 renin 분비 자극에 의해 반감기가 긴 acidic renin form쪽(Shier & Malvin, 1975)으로 전이가 되며 stroke-prone spontaneously hypertensive rat(Sessler et al., 1985)나 Goldblatt hypertensive rat(Sessler & Malvin, 1985)에서도 동일한 변화를 보고하였다. 백서 신피질의 외층, 중층 그리고 내층에서 유리되는 renin량은 매우 상이하나 renin profile은 큰 변화를 보이지 않았던 본 실험결과와는 동일한 renin profile이 신피질의 어느 부위에

서나 분비되고 있다는 것을 제시한다. 또한 SHR의 renin profile이 정상혈압백서인 SDR과 WR이 유 의한 차이를 보이지 않았던 것은 RAS가 활성화된 stroke-prone SHR과는 달리 RAS가 억제되어서 renin 분비량이 적기 때문인 것 같다. 이는 renin 분비의 negative feedback inhibitor인 angiotensin II에 의해 60% 이상의 renin 분비 억제나 고식염섭취시 renin profile은 변화하지 않은 보고(Sessler et al., 1986)와 일치하였다.

그러나, TMB-8에 의해 renin 분비가 증가되었음에도 불구하고 renin profile의 변화를 볼 수 없었던 본 실험결과는 생체의 실험에서 verapamil이나 isoproterenol등의 renin 분비 자극에 의하여 분비된 renin profile이 반감기가 긴 acidic renin form으로 전이된다고 보고(Katz & Malvin, 1982; Sessler et al., 1986)와는 상이하다. 이는 신장피질 부위에 따른 반응성의 차이를 보기 위해 renin 분비를 증가시킬 수 있는 TMB-8 농도중 저농도를 이용하였기 때문에 renin profile의 변화를 발견할 수 없었던 것이 아닌가 사료된다. 3일간 탈수한 백서에서 alkaline renin form은 감소하고 acidic renin form이 증가하는 경향을 보인 것은 탈수와 유사한 자극인 양측부신제거에 의해 acidic renin form이 증가한 보고(Sessler et al., 1986)와 유사한 결과이나 증가가 현저하지 않은 것은 양측 부신제거에 의한 탈수효과가 더 크기 때문인 것으로 사료된다.

결 과

정상혈압백서인 SDR, WR과 자연발생적 고혈압 백서인 SHR의 신피질에서 부위에 따른 renin 유리의 heterogeneity와 isoelectric renin heterogeneity를 비교하여 이들이 갖는 생리적 의미를 구명하려 하였다.

1) 각종 백서에서 basal renin release는 신피질의 층에서 가장 높았으며, SHR에서의 basal renin release는 SDR과 WR에 비해 낮았다.

2) 탈수처리한 백서에서의 혈장 renin 활성도는 현저히 증가하였고, basal renin release는 SDR에서는 증가하였으나 WR와 SHR에서는 변화하지 않았다.

3) 각종 백서에서 TMB-8에 의한 renin 분비의 증가는 SDR과 WR에서는 신피질중층에서 가장 높았으며, 외층과 내층에서는 유사하였다. 그러나 SHR은 외층과 중층에서 유사한 반응을 보였으며, 내층은 거의 반응하지 않았다.

4) 탈수처리한 WR에서 TMB-8에 의한 renin 분비 증가현상은 신피질중층과 내층에서 강화되는 경향이 있었으며, SHR에서는 신피질내층에서는 현저히 강화되었다.

5) 신장피질의 부위에 따른 renin profile은 유의한 변화를 보이지 않았으며, strain간에도 유의한 차이를 발견할 수 없었다. TMB-8에 대한 renin 유리가 증가함에도 불구하고 renin profile은 변화하지 않았다.

6) 탈수처리한 각종 백서에서 alkaline renin은 감소하고 acidic renin은 증가하였다.

이상의 결과는 TMB-8에 의한 renin 분비 반응성이 부위에 따라 다른 것은 아마도 신장피질의 vasculo-tubular pattern의 차이거나 JG cell의 Ca^{2+} 농도 변화에 의한 renin 분비조절의 차이에 의한 것으로 추측되며, 탈수처리한 백서에서의 약물 반응성의 약화는 탈수에 의한 신혈류량의 변화에 의한 것이라 사료된다. 이러한 신피질 부위에 따른 약물 반응성의 차이는 신혈류량의 변화, 사구체여과물 및 sodium의 세뇨관 재흡수의 변동에 기인할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

실험을 위하여 도와준 남경화, 나은진양에게 감사의 뜻을 여기에 표하고자 합니다.

REFERENCES

Barratt LT, Wallin JD, Rector FC & Seldin DW (1973). Influences of volume expansion on single nephron filtration rate and plasma flow in the rat. *Am J Physiol* 224, 643-650

Brown JJ, Davis DD, Lever AF, Parker RA & Robertson JIS (1965). The assay of renin in single glomeruli in the normal rabbit and the apparatus of the juxtaglomerular apparatus. *J Physiol (Lond)* 176, 418-428

Cho KW & Malvin RL (1979). Renin inactivation during in vitro experiment. *Am J Physiol* 236, F501-F504

Cho KW & Kim SH (1982). Factors affecting the relationship between renal renin activity and plasma renin activity. *Kor J Physiol* 16, 63-69 (in Korean)

Cho KW, Kim SH & Koh GY (1987). Radioimmunoassay and characterization of renin-angiotensin system in the fresh-water turtle. *J Exp Zool* 242, 255-263

Choi IS (1986). Effect of several factors on the renin secretion in spontaneously hypertensive rats. *Chonnam Univ Grad Sch Doctor Thesis (in Korean)*

Davalos M, Frega NS, Saker B & Leaf A (1978). Effect of exogenous and endogenous angiotensin II in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 235, F605-F610

De Rouffignac C, Bonralet JP & Menard J (1974). Renin content in superficial and deep glomeruli of normal and salt-loaded rats. *Am J Physiol* 226, 150-174

De Rouffignac C, Berjal G, Bencsath P & Bonvalet JP (1972). Relation between some morphological and physiological factors and the single nephrons glomerular filtration rate. *Intern Symp Renal handling of sodium, Breatenberg Basel Karger*, 207-226

De Vito E, Gordin SM, Cabrera & Fasciolo JC (1970). Release of renin by rat kidney slices. *Am J Physiol* 219, 1036-1041

Druilhet RE & Overturff ML (1981). Separation of multiple forms of renin from human, rabbit, hog and baboon kidney by isoelectric focusing. In Heterogeneity of Renin and Renin-substrate. *Edited by MP Sambhi, Elsevier North Holland Inc, New York*

Farup P (1971). Morphological aspects of the renin-angiotensin system. *Acta Pathol Microbiol Scand (Suppl)* 222, 1-96

Freeman RH, Davis JO, Vasano-Aharon N, Ulick S & Weiberger MH (1975). Control of aldosterone secretion in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 37, 66-71

Frega NS, Davalos M & Leaf A (1980). Effect of endogenous angiotensin on the efferent glomerular arteriole of rat kidney. *Kidney Int* 18, 323-327

Gavas H, Brown JJ, Lever AF & Robertson JIS (1970). Changes of renin in individual glomeruli in response to variations of sodium intake in the rabbit. *Clin Sci*

- 38, 409-414
- Goodfriend TL, Levine L & Fasman GD (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of cabodiimides in immunology. *Science* 144, 1344-1346
- Horiuchi K, Tanaka H, Yamamoto K & Ueda J (1971). Distribution of renin in the dog kidney. *Life Sci* 10, 727-734
- Horster M & Thurau K (1968). Micropuncture studies on the filtration rate of a single superficial and juxtamedullary glomeruli in the rat kidney. *Arch Ges Physiol* 301, 162-181
- Jackson B & Oken DE (1982). Internephron heterogeneity of filtration fraction and disparity between protein and hemaocrit-derived values. *Kidney Int* 21, 309-315
- Jamison RL & Lacy FB (1971). Effect of saline infusion on superficial and juxtamedullary nephrons in the rat. *Am J Physiol* 221, 690-697
- Jensen PK, Blalhr H & Steven K (1984). Evaluation of the micropuncture determination of single nephron filtration fraction. *Kidney Int* 25, 486-491
- Jones SM, Torretti J, Williams JS & Weinberger SF (1979). Regional renin release by the cat kidney in vitro and in vivo. *Am J Physiol* 237, F188-F195
- Katz MA, Blantz RC, Rector FC & Sellin DW (1971). Measurement of intrarenal blood flow. I. Analysis of microsphere method. *Am J Physiol* 220, 1903-1913
- Katz SA & Malvin RL (1982). Isoelectric focusing heterogeneity of secreted renin differs after beta-adrenergic stimulation. *Endocrinol* 111, 814-819
- Katz SA & Malvin RL (1984). Changes in salt intake alter the release of multiple renin species in a non-uniform manner. *Renal Physiol* 7, 275-292
- Kirkebo A & Tysseboth I (1974). Distribution of renal cortical blood flow during hemorrhagic hypotension in conscious dog. *Acta Physiol Scand* 91, 22-31
- Matin-Dupont P, Cambar J & Brothier JP (1984). Effects of verapamil—a calcium inhibitor—on the vasomotor response of cortical and juxtamedullary glomeruli of the human kidney. *Renal Physiol* 7, 72-77
- NcNay JL & Abe Y (1970). Pressure-dependent heterogeneity of renal cortical blood flow in dogs. *Circ Res* 27, 571-587
- Park CS, Malvin RL, Murray RD & Cho KW (1978). Renin secretion as a function of renal renin content. *Am J Physiol* 234, F506-F509
- Rurghardt W, Scweisfurth H & Dahlheim H (1982). Juxtglomerular angiotensin II formation. *Kidney Int* 22 (Suppl 12) s49-s54
- Sealey JE & Laragh JH (1973). Searching out low renin patients: Limitation of some commonly used methods. *Am J Med* 55, 303-314
- Sessler FM & Malvin RL (1985). Modification of renin isoelectric heterogeneity in Goldblatt hypertensive rat. *Am J Physiol* 248, E694-E698
- Sessler FM, Jakelainen PT, Malvin RL & Stract AM (1985). Genetic relationship between multiple renin form and blood pressure in spontaneously hypertensive stroke prone rats (SHRSP) and Wistar Kyoto rats (WKY). *Fed Proc* 44, 630
- Sessler FM, Kim SH & Malvin RL (1986). Changes of renin isoelectric heterogeneity after acute and chronic stimulation of renin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 182, 258-262
- Seul KH (1987). Characteristics of regional renin release by the rat kidney slices. *Jeonbuk Nat Univ Grad Sch Master Degree Thesis (in Korean)*
- Shier DN & Malvin RL (1985). Differential secretion and removal renin forms. *Am J Physiol* 249, R79-R84
- Shiono K & Sokabe H (1976). Renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 231, 1295-1299
- Slokoff LM, Logan A, D'Avella J & Eisner GM (1971). Microsphere measurement of intrarenal circulation in the dog. *Circ Res* 28, 158-166
- Stein JH, Ferris TF, Huprich JE, Smith TC & Osgood RW (1971). Effect of renal vasodilatation on the distribution of cortical blood flow in the dog kidney. *J Clin Invest* 50, 1429-1438
- Stein JH, Boonjarern S, Mauk RC & Ferris TF (1973). Mechanism of the renal blood flow during hemorrhagic hypotension in the dog. *J Clin Invest* 52, 47-49
- Steiner PK, Blalhr H & Steven K (1979). Glomerular hemodynamics in rats with chronic salt depletion. Effect of salarasin. *J Clin Invest* 64, 503-512
- Torretti J & Weberger SF (1978). Renin release by outer and inner cortical slices of cat kidney. Differences in the rate of release and in the response to norepinephrine. *Kidney Int* 14, 704
- Trueta J, Barcaly AE, Daniel PM, Franklin KJ & Pritchard ML (1947). Studies of the renal circulation. *Blackwell (Basil) Mott Ltd, Oxford*