

Adenine 유발 신부전 흰쥐에서의 뇨중 Kallikrein의 변화

이태웅 · 서석수 · 이경희 · 양한석 · 정준기* · 최재수**

부산대학교 약학대학, *부산수산대학교 어병학과, **부산수산대학교 식품영양학과

(Received October 30, 1991)

Urinary Change of Kallikrein in Adenine-Induced Renal Failure Rat

Tae Woong Lee, Suk Soo Seo, Kyung Hee Lee,
Han Suk Young, Joon Ki Chung* and Jae Sue Choi**

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735

*Department of Fish Pathology, National Fisheries University of Pusan 608-737

**Department of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan 608-737

Abstract—In order to investigate whether the function of distal nephron is disturbed in adenine-induced renal failure rats, we measured the urinary kallikrein level in adenine-ingesting rats fed on 0.75% adenine diet for 1 to 10 days. Administration of 0.75% adenine to rats significantly increased blood urea nitrogen level and urine volume, while the level of kallikrein along with the urinary excretions of urea and inorganic phosphate were significantly decreased. From these results, it is suggested that adenine-induced renal failure is caused by early deterioration of distal nephron as well as proximal nephron.

Keywords □ Adenine-induced renal failure rat, blood urea nitrogen, urinary kallikrein.

신부전은 질소화합물의 축적, 전해질 및 phosphate 대사이상으로 증명되는 만성적이며 진행성인 신기능의 악화로 정의되는 질병으로서 종종 고혈압이나 당뇨병과 같은 합병증을 유발하는 경우가 많아 근년에 와서 만성신부전에 대한 관심이 높아지고 있다.^{1,2)} 한편 이런 만성신부전을 연구하기 위하여 신질제술에 의한 흰쥐의 신부전모델³⁾이 개발되어 널리 쓰이고 있지만 이의 제조에는 많은 시간 및 조작이 필요하고 외과적 수술의 결과 다른 감염증의 가능성도 많은 것이 사실이다. 이런 상황에서 최근 Yokozawa 등은 흰쥐의 신부전모델 제조에 대한 새로운 시도로서 adenine 투여에 의해 비교적 간단하게 흰쥐의 신부전모델을 제조하는 방법을 보고하고 있으며 이들 결과에 따르면 계속된 adenine 투여에 의하여 혈중 뇨소, 크레아티닌의 상승, methylguanidine 및 guanidosuccinic acid와 같은 중분자뇨독소의 축적, 전해질대사의 이상을 유발하였으며 현저한 신기능 저하

현상을 보여 사람에게 있어서의 신부전 현상과 유사한 증상을 나타낸다고 보고하고 있다.⁴⁻⁷⁾ 이에 저자 등은 adenine이 신기능에 영향을 미치는 작용기전을 알기 위하여, 신기능의 중요한 조절인자로서 널리 알려져 있는 prostaglandin계에 대하여 검토하여 adenine 투여에 의한 prostaglandin계의 대사 이상을 확인하고 보고한 바 있다.⁸⁾ 본 실험에서는 prostaglandin계와 밀접한 관련성을 가지고 있으며 신기능 조절의 또 다른 중요한 인자로서 널리 알려져 있는 kallikrein 계에 이상이 있을 가능성에 대해 정상군 및 adenine 투여군을 비교 검토한 결과 유의성 있는 변화를 관찰하였기에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험동물 및 시약—실험에는 체중 200~210 g의 Wistar계 웅성 흰쥐를 사용하였으며 DL-Val-Leu-Arg

Table I—Composition of 18% casein diet

Component	%
Casein	18
α -Cornstarch	57.9
Sucrose	15
Soybean oil	2
Salt mixture	4
Vitamins mixture	1
Cellulose powder	2
Choline chloride	0.1

p-nitroanilide 및 aprotinin은 Sigma사에서 구입하여 사용하였고 나머지 시약은 시약특급을 사용하였다. 흰쥐는 일주일간의 적응기간을 가지고 적응기간 동안 고형식으로 사육하였으며 실험기간 동안 정상군은 18% casein식을, adenine 투여군은 18% casein에 0.75%의 adenine을 첨가하여 물과 함께 자유롭게 섭취하도록 하였다. 뇨는 대사 cage를 사용하여 매일 오전 9시에 채취하였으며 원심분리한 후 각 성분의 측정용을 위하여 -80°C 에 동결보존하였다. 18% casein식의 조성을 Table I에 나타내었다.

Kallikrein의 측정—Kallikrein의 활성은 Amundsen 등의 방법에 의해 측정하였다.⁹⁾ 적절하게 희석된 뇨 400 μl 와 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.2) 500 μl 를 포함하는 반응액에 100 μl 의 1 mM DL-Val-Leu-Arg p-nitroanilide를 첨가하고 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 50% AcOH 100 μl 를 가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광분석하였다. 대조군은 aprotinin(10 KIU/ml)을 함유하는 Tris-HCl buffer를 사용하였으며 다른 시약은 동일하게 조작하였다. 분당 1 μM 의 기질을 분해하는 kallikrein의 활성을 1 unit로 하였다.

혈액 및 뇨중성분의 분석—혈중 blood urea nitrogen(BUN)은 urease-indophenol법에 의한 Kit(WAKO)를 사용하여 측정하였으며 뇨중 urea는 Archibald의 방법에 따라 측정하였다.¹⁰⁾ 뇨중 creatinine은 Folin-Wu 방법에 의한 Kit로, 무기인은 molybdenum blue 방법에 의하여 측정하였다.¹¹⁾

통계처리—대조군과 실험군과의 유의성의 검토는 Student's t-test로 하였으며 p값이 0.05보다 작을 때 유의성이 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

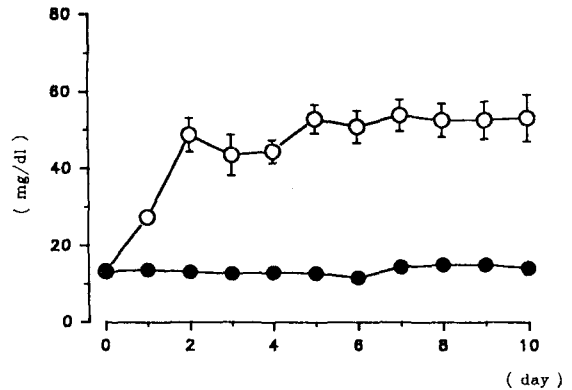


Fig. 1—Time course changes of blood urea nitrogen in both normal and adenine treated rats. Values are means \pm S.E. of 8 rats. Significant differences from normal values are observed by level of $p < 0.01$.

혈중 BUN의 변화—정상군과 adenine 투여군의 혈중 뇨소성질소의 변화는 Fig. 1과 같다. 실험시작과 동시에 정상군에 18% casein식을, 실험군에 0.75% adenine 함유 18% casein식을 투여하면서 매일 미정맥으로부터 채혈하여 BUN을 측정된 결과, 정상군은 실험 시작전의 13.3 ± 0.72 mg/dl부터 실험 종료시인 10일째의 14.29 ± 0.86 mg/dl의 안정된 범위에서 BUN치를 유지한 반면에 0.75% adenine 투여군은 투여 1일째부터 27.42 ± 1.16 mg/dl(205%, $p < 0.01$)로 유의하게 증가하기 시작하여 투여 2일째의 48.77 ± 4.39 mg/dl(370%, $p < 0.01$)에서 투여 10일째의 53.34 ± 6.14 mg/dl(400%, $p < 0.001$)까지 실험 전기간에서 BUN의 유의한 증가를 나타내었다.

혈중 뇨소는 뇨독증 상태를 나타낼 수 있는 화학물의 저류를 나타내는 지표로서 사용될 수 있으며 또한 BUN 값은 사구체여과에 의존하고 있기 때문에 신기능의 하나의 지표로서 사용될 수 있다.¹²⁾ 이런 사실로부터 본 실험에서 0.75% adenine 투여에 의한 혈중 BUN의 증가는 신기능의 저하에 의한 뇨중으로의 urea 배설이 감소한 때문이라고 사료된다.

뇨중 성분의 변화—Adenine 투여에 의한 뇨중 성분의 변화를 Table II에 나타내었다. 뇨량은 adenine 투여 3일째까지 투여군에서 정상군과 비교하여 증가 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 인정할 수 없었다. 그러나 4일째의 adenine 투여군은 정상군의

Table II—Changes of urinary constituents in both normal and adenine treated rats

Day	Urine volume(ml/day)		U-urea(mg/day)		U-creatinine(mg/day)		U-phosphate(mg/day)	
	Normal	Adenine	Normal	Adenine	Normal	Adenine	Normal	Adenine
1	17.50±0.93	22.06±2.04	351.55±50.46	159.54±23.50 ^{b)}	5.93±0.18	5.68±0.24	28.08±0.63	15.21±1.13 ^{c)}
2	17.38±1.10	26.19±3.47 ^{a)}	330.63±24.45	75.96±12.52 ^{c)}	6.17±0.11	6.12±0.27	29.78±1.01	13.90±1.18 ^{c)}
3	19.88±1.86	21.38±2.98	349.99±19.70	234.84±37.61 ^{a)}	6.94±0.12	6.03±0.38	29.08±1.38	16.58±1.63 ^{c)}
4	14.63±0.91	24.56±4.28 ^{b)}	486.66±54.93	348.59±39.45 ^{a)}	6.80±0.17	6.39±0.32	30.39±1.70	17.60±1.58 ^{c)}
5	13.69±1.27	25.13±3.20 ^{b)}	373.56±67.25	186.11±19.29 ^{a)}	6.78±0.19	6.18±0.29	27.34±3.06	13.34±1.44 ^{c)}
6	14.50±1.20	32.44±2.70 ^{c)}	360.93±61.27	192.82±22.85 ^{a)}	7.33±0.20	6.10±0.42 ^{a)}	27.51±2.73	12.15±1.46 ^{c)}
7	12.50±0.85	32.44±2.22 ^{c)}	405.40±62.75	207.04±18.52 ^{b)}	6.76±0.29	5.01±0.22 ^{b)}	30.03±3.10	11.23±1.13 ^{c)}
8	13.50±1.21	38.06±3.19 ^{c)}	482.80±67.02	256.76±21.66 ^{b)}	7.00±0.33	5.88±0.31	30.83±2.50	12.80±1.16 ^{c)}
9	14.44±0.85	40.06±3.51 ^{c)}	640.67±52.47	452.93±29.80 ^{b)}	8.04±0.22	7.91±0.42	33.20±1.70	16.74±1.69 ^{c)}
10	13.19±0.99	38.63±2.85 ^{b)}	522.48±36.06	402.77±26.13 ^{a)}	7.74±0.22	7.79±0.37	30.93±1.40	16.54±1.42 ^{c)}

Values are means±S.E. of 8 rats. ^aSignificantly different from normal values, ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001.

14.63±0.91 ml/day에 비하여 24.56±4.28 ml/day로 유의하게 증가하였으며 실험 종료시인 10일째에는 정상군과 비교하여 약 3배의 현저한 다뇨현상을 나타내었다. 뇨중 urea는 adenine 투여 1일째 및 2일째에 정상군의 351.55±50.46, 330.63±24.45 mg/day와 비교하여 adenine 투여군에서 각각 159.54±23.50 (45%, p<0.001), 75.96±12.52 mg/day(23%, p<0.001)로서 급격한 감소를 나타내고 3일째부터 약간 증가하였으나 실험 전기간에 걸쳐 정상군과 비교하여 유의하게 감소되어 뇨소배설부전 현상을 나타내었다. 뇨중 creatinine은 adenine 투여 6일, 7일 및 8일째에 투여군에서 유의하게 감소하였으며 실험 전기간에 걸쳐 감소경향을 나타내었다. 뇨중 phosphate는 adenine 투여 1일째에 정상군의 28.08±0.63 mg/day와 비교하여 투여군에서 15.21±1.13 mg/day(p<0.001)로 유의하게 감소하였으며 실험 종료시인 10일째까지 현저한 감소현상을 나타내어 전체적으로 약 50%의 배설감소를 나타내었다.

정상상태에서 adenine은 purine salvage 효소인 adenine phosphoribosyl transferase(APRT)에 의해서 adenine monophosphate로 전환된다. 그러나 Koeda 등에 따르면 APRT의 결핍상태 혹은 과량의 adenine 농도에서는 xanthine oxidase에 의해서 adenine은 2, 8-dihydroxyadenine(DHOA)으로 전환되고 물에 난 용성인 DHOA는 신장 특히 근위뇨세관에서 결정으로 석출되며 adenine 투여가 계속되어 DHOA의 성장이 계속되면 근위뇨세관의 기계적인 손상은 심해지고 microvilli를 포함하는 외피세포의 파괴적인 변화를

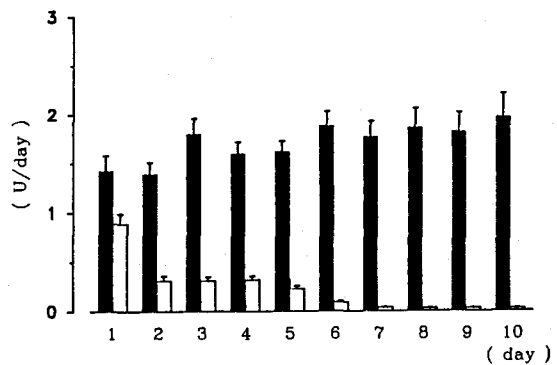


Fig. 2—Urinary excretion of kallikrein in both normal and adenine treated rats.

Values are means±S.E. of 8 rats. Significant differences from normal values are observed by level of p<0.01.

초래하는 것으로 보고되고 있다.¹²⁾ 따라서 본 실험에서 뇨중으로서의 urea, creatinine 및 phosphate의 배설감소는, 혈중 질소화합물을 포함한 phosphate의 항상성은 주로 신장배설을 조절함으로써 얻어지고 근위뇨세관의 재흡수가 중요한 역할을 하고 있다는 사실로 미루어, 이러한 근위뇨세관의 이상을 포함하는 신기능의 저하에 의한 것으로 사료된다.

뇨중 kallikrein의 변화—Fig. 2는 adenine 투여에 의한 뇨중 kallikrein 활성의 변화를 나타내고 있다. 정상군의 뇨중 kallikrein은 실험 1일째의 1.42±0.16 U/day부터 실험 10일째의 1.97±0.24 U/day로 일정한 범위를 나타내고 있는데 반하여 adenine 투여군은

투여 1일째에서 0.89 ± 0.10 U/day로 38% ($p < 0.05$) 유의한 감소를 보이고 adenine 투여일수가 증가될수록 현저하게 감소하여 2일째에 78% ($p < 0.001$), 3일째에 83% ($p < 0.001$) 감소하였으며 adenine 투여 7일째부터 실험 종료시인 10일째까지 약 98%의 현저한 감소를 나타냈다.

뇨중의 kallikrein은 신장에서 합성되며 저분자 kininogen으로부터 활성화된 kinin을 생성하고 kinin은 phospholipase A_2 를 활성화시켜 그 결과 prostaglandin의 전구체인 arachidonic acid를 생성한다. Prostaglandin은 이 호르몬들이 신장내의 여러 부위 즉, 사구체, 간질세포, 내피세포 및 원위뇨세관 등에서 생성되어 사구체의 mesangium 세포를 수축 또는 확장시키므로써 사구체 혹은 신장전체로서 항상성을 유지하게 함으로써 신기능을 조절하고 있는 중요한 조절인자로서 알려져 있다.¹³⁾ 한편 신장 prostaglandin계와 kallikrein-kinin계는 서로 밀접한 관계를 가지고 있다는 것을 시사하고 있는 많은 증거가 있는데 Nasjletti¹⁴⁾ 및 Colina-Chourio 등¹⁵⁾은 뇨중 prostaglandin과 kallikrein은 어떤 실험상황에서 밀접하게 변동하고 있으며 적출된 가토의 신장에서 prostaglandin 생성은 내부적으로 생성된 kinin에 의존하고 있다는 것을 보이고 있다. 이와 아울러 저자 등⁸⁾은 전 실험에서 adenine 투여 rat에서 뇨중 prostaglandin이 감소되어 있는 것을 보고한 바 있는데 이는 본 실험에서 확인된 사실과 같이 뇨중 kallikrein이 급격히 감소되어 있는 것과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

한편, 신장 kallikrein의 90% 이상이 피질에서 발견되고 이것은 외피질에서 내피질로 갈수록 감소되며 수질과 papilla에서는 거의 발견되지 않는다. Scicli 등은 stop-flow 기술을 이용하여 개의 신장에서 kallikrein은 원위뇨세관에서 뇨중으로 배설되는 것을 보였으며 immunohistochemical 기술을 이용한 많은 실험들은 사람과 rat의 신장 kallikrein은 꼭부원위뇨세관에 존재하고 있는 것을 보이고 있다.^{16,17)} 본 실험에서 adenine 투여에 의해 뇨중 kallikrein이 급격히 감소하는 결과로부터 adenine은 근위뇨세관 뿐만 아니라 원위뇨세관에도 영향을 미치고 있다는 사실을 알 수 있었으며 gentamicin 등과 같은 aminoglycoside계 항생제의 근위뇨세관의 손상에 의한 급성 신부전의 발병 기전과는 차이가 있음을 알 수 있다. 아울러 Girolami 등¹⁸⁾도 cadmium의 신장원위부에

대한 독성 지표로 뇨중 kallikrein의 급격한 배설감소를 보고하고 있는 점은 흥미로운 사실로 주목하고 싶다. 그러나 뇨중 kallikrein의 변화가 신장 내부의 kallikrein의 변동을 나타내는 절대적인 지표가 될 수 있는 지에 관해 논의의 여지가 있는 것도 사실이므로 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

문 헌

- 1) Depner, T.A. and Gulyassy, P.F.: Chronic renal failure, In *Disease of the kidney* (Ed by Strauss, M.B. Welt, L.G.). Boston, Little Brown, 211(1979).
- 2) Leaf, A. and Cotran, D.S.: Chronic renal failure. In "Renal pathophysiology" (Ed by Leaf, A. and Cotran, R.S.). Oxford University Press, New York, 191(1985).
- 3) Platt, R., Roscoe, M.H. and Smith, F.W.: Experimental renal failure, *Clin. Sci.* **11**, 217(1952).
- 4) Yokozawa, T., Zheng, P.D., Oura, H. and Koizumi, F.: Animal model of adenine induced chronic renal failure in rats. *Nephron* **44**, 230(1986).
- 5) Yokozawa, T., Fujitsuka, N. and Oura, H.: Production of methylguanidine from creatinine in normal rats and rats with renal failure. *Nephron* **56**, 254 (1990).
- 6) Yokozawa, T., Wu, X.Q., Lee, T.W. and Oura, H.: Ompi-to administration increases renal function in rats with renal failure. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 179(1988).
- 7) Yokozawa, T., Wu, X.Q., Lee, T.W. and Oura, H.: Effects of Ompi-to on the urinary levels of prostaglandin and kallikrein in rats with renal failure. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **6**, 188(1989).
- 8) Yokozawa, T., Chung, H.Y., Lee, T.W. and Oura, H.: Renal function and urinary prostaglandins in rats given an adenine diet. *Jpn. J. Nephrol.* **31**, 671 (1989).
- 9) Amundsen, E., Putter, J., Friberger, P., Knos, M., Larsbraten, M. and Claeson, G.: Method for the determination of grandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate. *Adv. Exp. Med. Biol.* **120A**, 83(1979).
- 10) Archibald, R.M.: Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.* **157**, 507(1945).

- 11) Wajima, T.: Inorganic phosphate. In "Rinsyo Kagaku Bunseki V" (Ed by Kitamura, M., Saito, M. and Niwa, M.), Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 116 (1973).
- 12) Koeda, T., Wakaki, K., Koizumi, F., Yokozawa, T. and Oura, H.: Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Jpn. J. Nephrol.* **30**, 239(1988).
- 13) Fuller, P.J. and Funder, J.W.: The cellular physiology of granular kallikrein. *Kidney Int.* **29**, 953 (1986).
- 14) Nasjletti, A., McGiff, J.C. and Colina-Chourio, J.: Interactions of renal kallikrein-kinin system and renal prostaglandin in the conscious rat. *Circ. Res.* **43**, 799(1978).
- 15) Colina-Chourio, McGiff, J.C., Miller, M.P. and Nasjletti, A.: Possible influence of intrarenal generation of kinins on prostaglandin release from the rabbit perfused kidney. *Br. J. Pharmacol.* **58**, 165 (1976).
- 16) Scicli, A.G., Carretero, O.A., Hampton, A., Cortez, P. and Oza, N.B.: Site of kininogenase secretion in dog nephron. *Am. J. Physiol.* **230**, 533(1976).
- 17) Orstavik, J.P. and Inagami, T.: The localization of kallikrein in the rat kidney and anatomical relationship to renin. *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 385 (1982).
- 18) Girolami, J.P., Bascands, J.L., Pecher, C., Cabos, G., Moatti, J.P., Mercier, J.F., Haguenoer, J.M. and Manuel, Y.: Renal kallikrein excretion as a distal nephrotoxicity marker during cadmium exposure in rats. *Toxicology* **55**, 117(1989).