한국현미경학회지 제38권 제2호 2008
Korean J. Microscopy 38(2), 141~148(2008)

분화중인 흰쥐 콩팥의 요세관에서 nNOS의 발현

송지현, 류시윤, 김 진[1], 정주영*
충남대학교 수의과대학 해부학교실, [1]가톨릭대학교 의과대학 해부학교실

Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Developing Rat Kidney

Ji-Hyun Song, Si-Yun Ryu, Jin Kim[1] and Ju-Young Jung*
Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine,
Chungnam National University, Daejeon, Korea
[1]Department of Anatomy, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea
(Received June 3, 2008; Accepted June 21, 2008)

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is an important regulator of renal blood flow, glomerular hemodynamics, and tubule transport processes in the kidney. There is also evidence that NO is involved in cell cycle regulation and mitotic division. During development the nNOS expression pattern differs from that observed in adult animals. However, little is known about temporal and spatial patterns of nNOS expression in the developing kidney. The purpose of this study was to establish the time of expression and the distribution of nNOS in the developing rat kidney. Kidneys from 14-, 16-, 17-, 18-, and 20-day-old fetuses, 1-, 4-, 7-, 14-, and 21-day-old pups, and adult animals were preserved and processed for immunohistochemistry. In the adult kidney, nNOS was detected in the parietal epithelium of Bowman's capsule, macula densa, descending thin limb and inner medullary collecting duct. nNOS immunoreactivity appeared first in the distal tubule anlage at 15 days of gestation, and in all epithelial cells of developing thick ascending limbs (TAL) as well as macula densa of 17- and 18-day-old fetuses. From 20 days of gestation to 14 days after birth, nNOS was expressed in the newly formed cortical TAL, which are located in the medullary ray, whereas in mature TAL of juxtamedullary nephrons, nNOS immunolabeling gradually decreased in intensity and became restricted to the macula densa. In inner medullary collecting ducts, nNOS immunoreactivity appeared first at 7 days after birth in the papillary tip and gradually ascended to the border between outer and inner medulla. In the descending thin limb and parietal epithelium of Bowman's capsule, weak nNOS immunoreactivity was observed at 14 days after birth and labeling gradually increased to adult levels at 21 days after birth. These results suggest that differential expression of nNOS in the developing kidney is an important physiological regulator of renal function during kidney maturation.

Keywords : nNOS, Pre-embedding immunohistochemistry, Developing rat kidney

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-003-E00005).
* Correspondence should be addressed to Ju-Young Jung, Department Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea. Ph.: (042) 821-8899, Fax: (042) 821-7926, E-mail: jyjung@cnu.ac.kr

서 론

Nitric Oxide (NO)는 지방친화성 (lipophilic)의 가스로서 단순한 생리학적 성분을 지니고 있으며, 한 개의 아미노산 분자인 L-arginine으로부터 합성된다 (Arnal et al., 1995). NO의 합성은 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 매개 되게 되는데, 현재까지 3가지 형태의 NOS isoforms이 알려져 있다. 이들이 처음에 어느 세포에서 발견되었느냐에 따라 이름을 붙여, NOS1, neuronal/cerebella (nNOS) 또는 brain NOS (nNOS), NOS2, inducible (iNOS) 또는 macrophage NOS (mNOS) 그리고 NOS3, endothelial NOS (eNOS)로 구분된다 (Bachmann et al., 1994). 콩팥에서 nNOS는 주로 치밀반의 상피세포와 수질집합관 (inner medullay collecting duct)에서 발현되며 iNOS는 피질집합관의 사이세포 (intercalated cell)와 굵은오름부분과 내림가는부분에 존재한다. eNOS 단백질은 주로 콩팥내 혈관의 내피세포에서 존재하는데 그 부위는 사구체의 내피세포 수출, 수입세동맥과 수질 내 곧은혈관 (medullary Vasa recta)이다 (Bachmann et al., 1994; Kone et al., 1999). NO는 발생중인 콩팥의 혈액역동학 (hemodynamic)적으로 중요한 조절인자로 인정받고 있다 (Bouloumie et al., 1999). 몇 가지 연구결과를 통해 NO는 발생중인 콩팥의 혈액순환 (renal blood flow)과 신사구체 여과율 (glomerular filteration rate)을 유지하고 조절하는 데 매주 중요한 기능을 수행하며, 출생 직후의 콩팥기능에 매우 효과적인 역할을 수행하고 있음이 밝혀졌다 (Ganger et al., 1992). 이러한 발생중의 NO의 기능들은 성체에서의 NO의 위치의 차이에서 기인한다. 발생중인 콩팥에서 nNOS는 출생 직후 급격히 증가하여 최고치를 형성하다 성장 과정 중에 점점 감소하여 성체에서는 최소치를 이루며, nNOS 피질과 수질에서 다른 기능을 수행한다 (Solhaug et al., 1996). 수질에서의 nNOS는 상대적으로 피질에 비해 적은양이 발현되나 성체에서는 그와는 반대로 오히려 피질에서 더 발현이 증가한다. 이러한 발현의 양상은 피질과 수질에서의 nNOS의 기능이 차이가 있음을 암시한다. 하지만 아직까지 발생과정중의 NO의 기능과 역할에 관하여는 아직까지 명확히 밝혀져 있지는 않다.

요세관의 형성은 흰쥐의 경우 출생직후 급격하게 증가하기 시작하여 출생 21일에 완성되는 것으로 알려져 있으며, 이때 요세관내에서의 세포증식과 세포자멸사가 중요한 역할을 함이 그동안의 연구를 통하여 밝혀졌다. 콩팥은 발생과정중 요관싹 (ureteric bud)과 뒤콩팥발생모체 (metanephrogenic blastema)에서 기원하며, 요관싹에서 분비되는 여러가지 activator에 의해 뒤콩팥발생모체내 중간엽세포 (mesenchymal cell)가 요세관 상피세포로 분화되는데 이들에 의해 자극받지 못하는 세포들은 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 제거되게 된다 (Coles et al., 1993). 중간엽세포가 요세관 상피로 분화된 후에도 요세관 각 부위에서 세포자멸사는 요세관의 형태형성에 깊이 관여하게 되는데, 속수질집합관에 발생과정중에 일시적으로 나타난 사이세포의 제거, 긴헨레고리 (long loop nephron)의 오름가는세관 (asecendign thin limb) 형성 및 콩팥소체 (renal corpuscle)의 벽상피 (parietal epithelium) 분화에 관여한다 (Kim et al., 1996). 특히 오줌농축에 중요한 역할을 하는 콩팥의 속수질 형성에는 굵은 오름부분에서의 세포자멸사에 의한 오름가는 부분의 형성이 가장 중요한 인자라 할 수 있다. 출생전의 콩팥은 오줌을 농축할 수 없으며, 콩팥의 요세관 중 짧은헨레고리 (short-looped nephron)로만 형성이 되어 있다. 출생 직후 이러한 짧은 헨레고리의 굵은오름부분의 먼쪽부위 (distal part)에서부터 세포자멸사가 나타나기 시작하여 출생후 3주에 걸쳐 오름가는부분으로의 transformation이 일어나게 된다 (Kim et al., 1996). 이러한 세포자멸사는 콩팥유두가 성장함에 따라 그 부위가 이동하며 결국 바깥수질 (outer medulla) 과 속수질 (inner medulla)의 경계 부위에서 멈추게 되어 긴 헨레고리 (long-looped nephron)를 형성하게 되어 정상적이 오줌농축능력을 구비 하게 된다. 콩팥 발생 초기에 요관싹에서 분비되어 세포자멸사를 저해하는 survival factor는 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않으나 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF), neurotropin 3, hepatocyte growth factor, nitric oxide 등이 거론되고 있다. 세포자멸사 (apoptosis)는 유전자 발현의 변화로 발생하는 세포자신의 파괴로서, 배형성 (embryogenesis)과 발생 (development)에서 중요한 역할을 할 뿐 아니라 성체에서도 끊임없이 일어나 형태 형성과 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 또한 여러 퇴행성 질환이나 종양의 발생 등에 매우 밀접하게 관련되어 있음이 알려져 세포자멸사에 미치는 세포의 내, 외적 인자에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다. 따라서 본 연구에서는 분화중인 요세관의 성장에 조절인자로서의 가능성을 확인하기 위해 발생중인 콩팥에서 nNOS의 발현 양상을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 모델 작성

실험동물은 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 사용하여 임신군과 출생후 군으로 나누어, 임신군은 (fetus) 18일 (F18), 20일 (F20) 군으로, 출생후 (pup)군은 1일 (P1), 4일 (P4), 7일 (P7), 14일 (P14), 21일 (P21) 그리고 성체로 나누어 각군에 5마리씩 사용하여 nNOS의 발현양상을 관찰하였다.

2. 콩팥의 고정 및 항체

각 실험동물은 sodium pentobarbital (50 mg/kg) 마취 하에

콩팥을 고정하였다. 복부대동맥을 통하여 0.01 M PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4)로 짧게 관류하여 혈액을 제거한 뒤 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)로 5분간 관류하고 난 후 콩팥을 절취하여 콩팥유두가 포함된 2 mm 두께의 횡단절편을 얻은 후 PLP에 담궈 4°C에서 12시간 더 고정하고 Vibratome을 사용하여 50 μm 두께의 조직절편을 제작하여 면역염색을 시행하였다. 발생과정중에 nNOS의 발현 변화를 관찰하기 위해 토끼에서 생산한 nNOS에 대한 다클론성 항체 (sigma)를 사용하였다.

3. 포매전 면역조직화학법

고정된 신장을 Vibratome으로 50 μm 두께의 조직절편을 제작하여 PBS (pH 7.4)로 씻은 다음, 조직에 남아 있는 aldehyde기를 제거하기 위하여 50 mM NH_4Cl (PBS)로 15분씩 3번 씻어내었다. 1차항체를 처리하기 전에 항체의 침투와 비특이성 반응을 줄이기 위하여 0.05% saponin, 0.2% gelatin 및 1% bovine serum albumin (BSA)을 PBS에 혼합한 액 (buffer A)에 2시간 처리하고, 그후 항체를 같은 1% BSA (PBS) (buffer B)에 희석비율이 각각 1 : 3,000이 되도록 혼합하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Buffer A로 20분씩 3번 씻은 후, 2차항체를 buffer B에 1 : 100으로 희석하여 실온에서 2시간 처리하였다. 2차항체로는 peroxidase conjugated donkey anti-rabbit IgG, Fab fragment (Jackson Immuno-Research Laboratory, USA)를 사용였고, Buffer A와 0.05 M Tris buffer (pH 7.6)로 각각 5분씩 3번 씻어준 후 0.1% 3,3′-diaminobenzidine (0.05 M Tris buffer)로 5분 처리하고, H_2O_2를 최종농도가 0.01%가 되도록 첨가하여 10분간 더 반응시

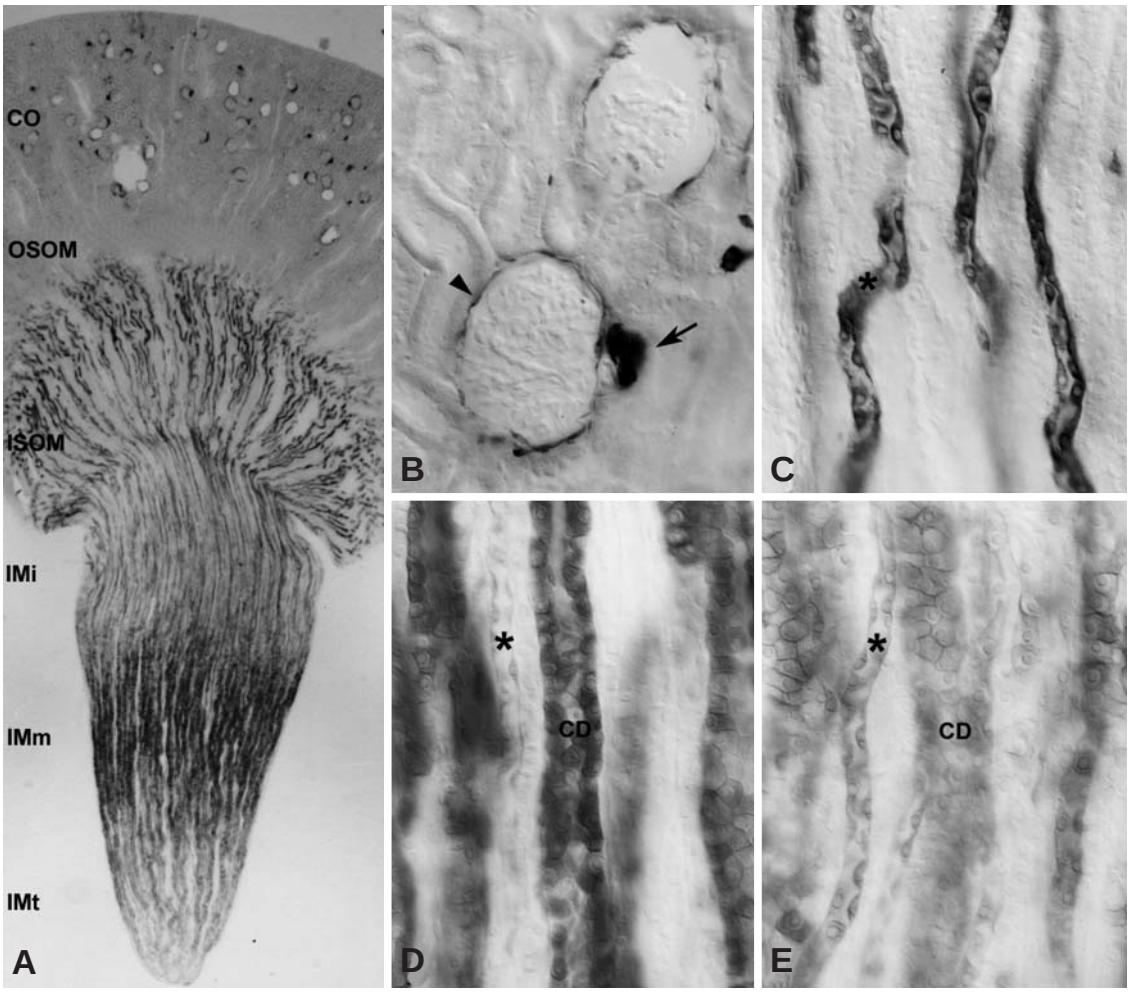

Fig. 1. Light micrographs of 50-μm-thick vibratome sections (A) from cortex (B), IS of outer medulla (C), middle part of IM (D), and terminal part of IM (E) of adult rat illustration immunostaining for nNOS. A: nNOS immunoreactivity was located in the cortex, outer medulla and inner medulla. B: there was strong nNOS immunoreactivity in macular densa and parietal epithelium of Bowman's capsule. C: in the IS of outer medulla, nNOS immunoreactivity was also present in the descending thin limb. D & E: there was stronger immunoreactivity for nNOS in the middle part than terminal part of IMCD; note the nNOS positive thin limb in the terminal part of IM. Magnification: ×20 (A); ×350 (B-D).

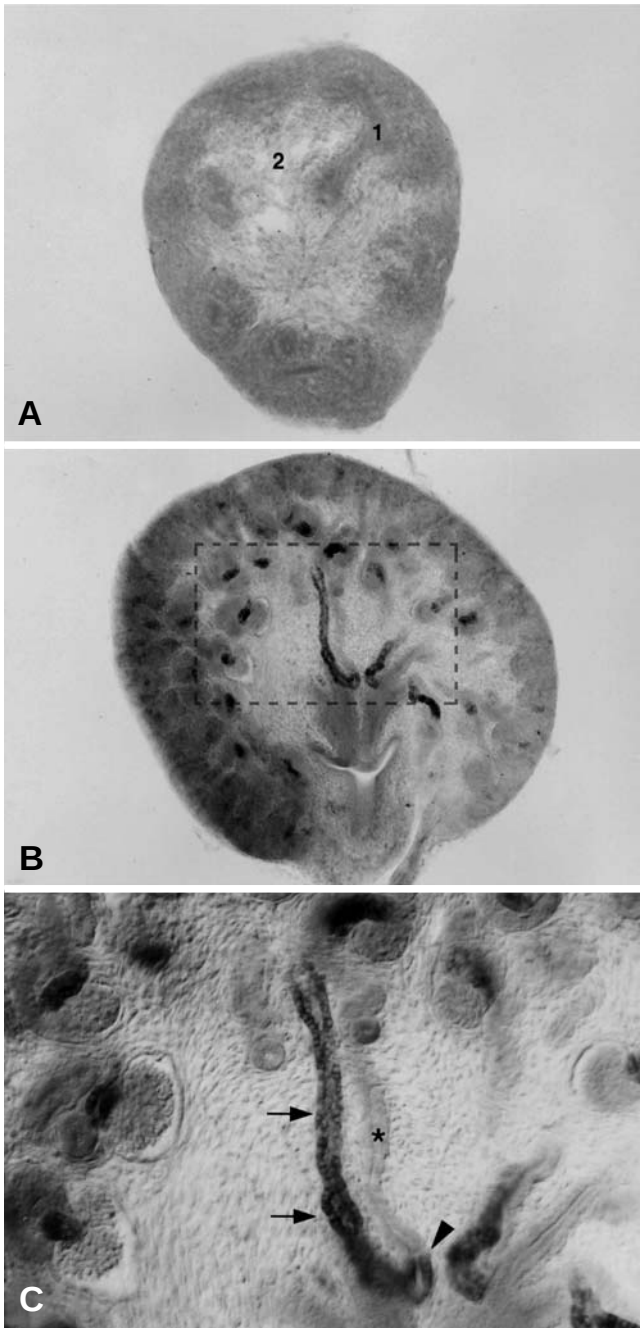

Fig. 2. Light micrographs of 50-μm-thick section from kidney of 14- (A) and 15-day-old fetus (B) illustrating nNOS immunostaining. A: there was no nNOS immunoreactivity in the condensed mesenchyme (1) and uncondensed mesenchyme (2) of 14-day-old fetus. B: nNOS immunoreactivity appeared in the inner cortex and medulla. C: higher magnification of area indicated by dot rectangle in B. There was no nNOS immunoreactivity in ascending limb of stage III nephron (*); note the abrupt transition (arrow head) to the strong labeled ascending limb (arrows). Magnification: ×16 (A & B); ×40 (C).

켜 발색 시켰다. 0.05 M Tris buffer와 0.1 M PB (pH 7.4)로 각각 5분씩 3번 씻은 후, 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 편평

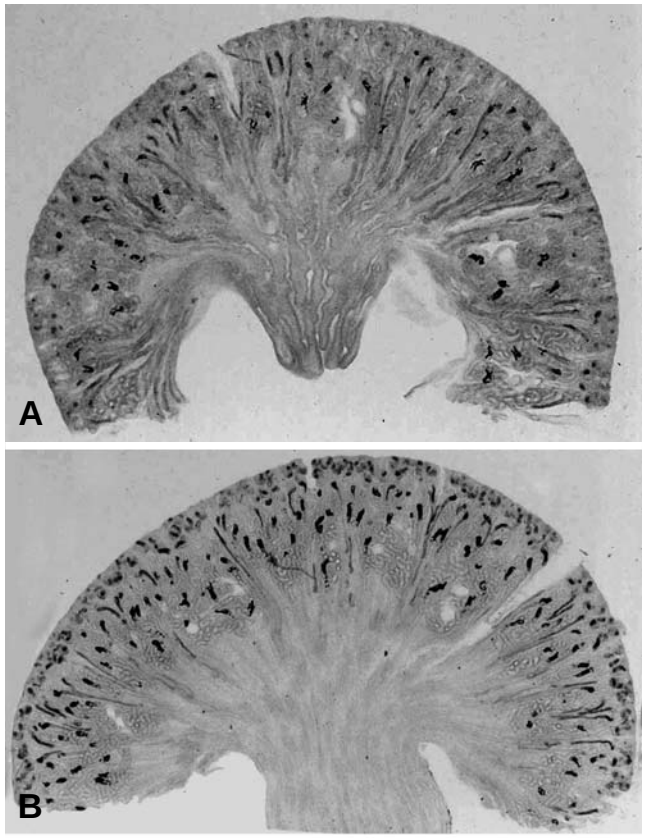

Fig. 3. Light micrographs of 50-μm-thick section from kidney of 4- (A) and 7-day-old pups (B) illustrating nNOS immunostaining. A: there was nNOS immunoreactivity in the developing thick ascending limb. B: nNOS immunoreactivity appeared in the outer cortex. Mgnification: ×16 (A & B).

하게 포매하여 관찰하였다.

결 과

1. 성체콩팥에서 nNOS의 발현

성체에서 nNOS의 발현은 바깥피질 (outer cortex), 바깥수질 (outer medulla) 및 속수질 (inner medulla)에서 관찰되었다 (Fig. 1A). 바깥피질에서 nNOS는 보우만주머니의 벽측 상피 (parietal epithelium)와 치밀반 (macula densa)에서 강하게 발현되었으며, 특히 치밀반에서 강한 면역반응성을 나타내었다 (Fig. 1B). 바깥수질의 경우 내림가는부분 (descending thin limb)에서 강하게 발현되었으며 오름가는부분에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 1C). 속수질에서 nNOS의 면역반응성은 수질집합관 (inner medullary collecting duct)과 내림가는 부분에서 관찰되었다. 특히 속수질집합관에서 면역반응성은 수질의 중간부위에서 가장 강하게 나타났으며, 시작부위와

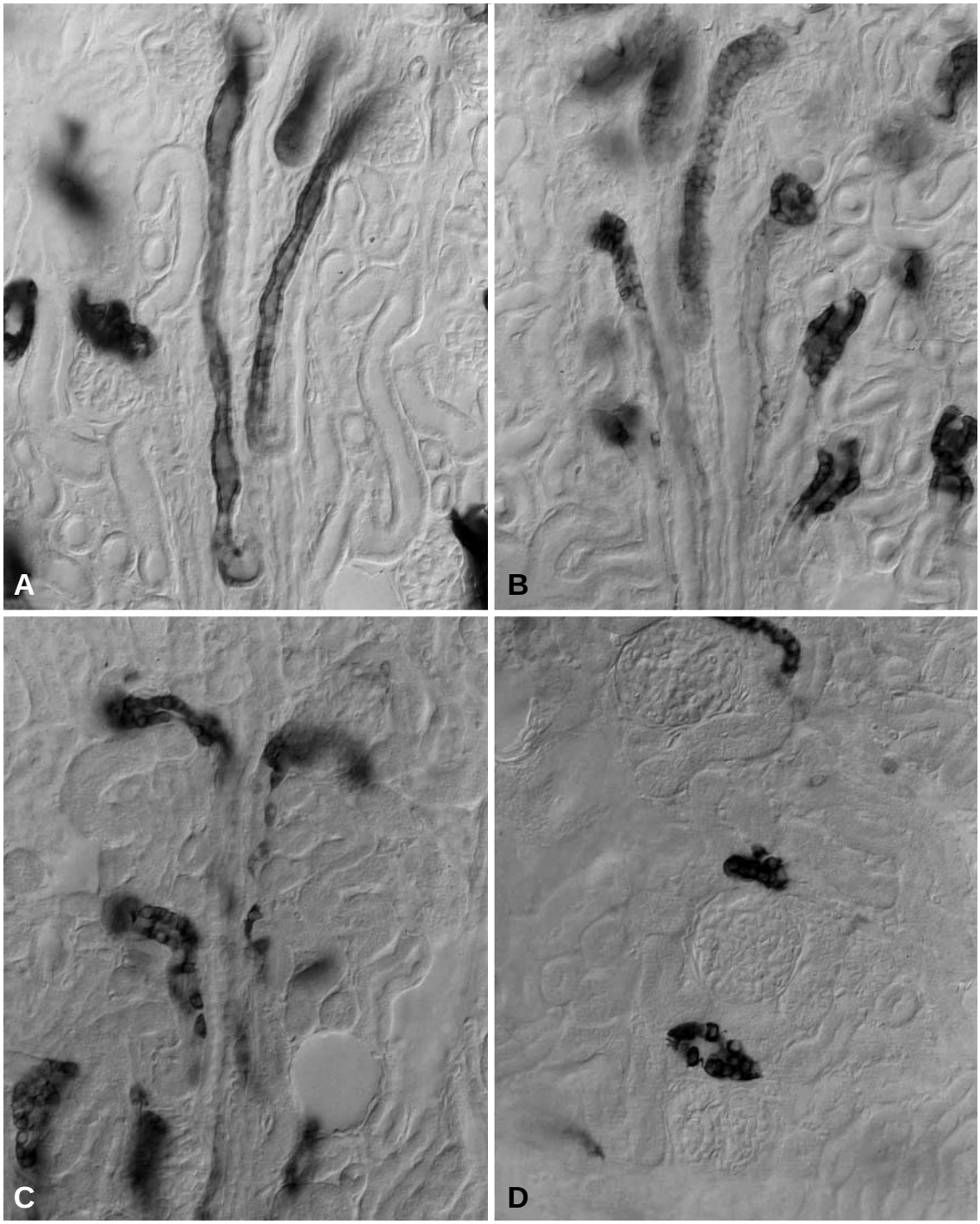

Fig. 4. Light micrographs of 50-μm-thick vibratome sections illustrating immunostaining for nNOS in the renal cortex of kidneys from 1- (A), 4- (B), 7- (C), 14- (D) day-old pups illustrating nNOS immunostaining. A: there was nNOS immunoreactivity in the newly formed thick ascending limbs. B-D: nNOS immunoreactivity disappeared in the thick ascending limbs. Magnification: ×200 (A-D).

말단부위에서는 면역반응성이 약하게 관찰되었다. 반면, 내림가는부분의 경우 속수질의 시작부위와 중간부위에서는 약하게 관찰된 반면 속수질의 말단 부위로 갈수록 면역반응성이 증가하였다(Fig. 1D, E).

2. 출생전 콩팥에서 nNOS의 발현

nNOS의 면역반응성은 임신 14일까지 관찰되지 않다가 임신 15일에 관찰되기 시작하였다(Fig. 2A, B). 임신 14일에

서의 nNOS는 밀집된 중간엽 (condensed mesencyme)이나 밀집되지 않은 중간엽 (uncondensed mesenchyme) 모두에서 관찰되지 않았다 (Fig. 2A). 반면 임신 15일에 발현이 관찰되기 시작하였으며, 그 발현은 속피질 (inner cortex)과 수질에서 관찰되었다 (Fig. 2B). 임신 15일에서 관찰되는 부위는 발생 3기 요세관 (stage III nephron)의 오름부분 (ascending limb)이었으며, 내림부분에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 2C). 임신 18일과 20일도 같은 경향을 나타내었다 (data not shown).

3. 출생후 콩팥에서 nNOS의 발현

출생후 nNOS의 면역반응성은 발생 초기에는 바깥피질과 속피질에서 관찰되어 새로이 형성되는 요세관에서 발현이 증가하는 경향을 나타내었다. 출생 4일의 경우 새로이 형성되는 요세관의 굵은오름부분에서 강하게 발현되었으며 후반부위로 갈수록 면역반응성이 증가하였다 (Fig. 3A). 출생 7일에는 요세관의 수가 증가함에 따라 nNOS의 면역반응성이 증가하였고 그양도 증가하였다 (Fig. 3B). 각 요세관에서 nNOS의 발현 양상을 자세히 관찰해 보면 발생 1일에는 내림가는부분과 굵은오름부분의 구별이 명확하며, 굵은오름부분의 전부위에 걸쳐 골고루 발현되었다 (Fig. 4A). 또한 새로이 형성되는 요세관에서도 발현되기 시작하였다. 출생 4일에서는 새로이 형성되는 요세관에서는 굵은오름부분의 전부위에서 관찰되었으며, 이미 생성되어 있던 요세관에서의 nNOS는 수질방향의 굵은오름부분에서 면역반응성이 감소하기 시작하였다 (Fig. 4B). 이러한 현상은 발생이 진행되면서 더욱 두드러져 발생 7일에는 굵은오름부분의 먼쪽부분에만 한정되어 발현되었다 (Fig. 4C). 결국 발생 14일에는 굵은오름부분의 요세관에서는 nNOS의 발현이 관찰되지 않았으며, 먼쪽 곱슬세관으로 이어지는 치밀반에 한정되어 발현되었다 (Fig. 4D).

고 찰

Sprague-Dawly계 흰쥐를 사용하여, 임신 16일, 18일 및 20일과 출생후 1일, 3일, 5일, 7일 및 14일, 그리고 성체 흰쥐 콩팥을 paraformaldehyde-lysin-periodate로 관류고정한 후 포매전 면역화학법을 통하여 nNOS의 분포부위를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

성체의 경우 피질에서는 치밀반과 보우만주머니에 수질에서는 바깥수질과 속수질의 가는내림부분과 속수질의 집합관에서 양성반응을 보였으며, 발생과정중의 콩팥의 경우 출생전에는 Nephrogenic zone의 distal anlage와 수질의 stage III 세뇨관의 오름부분에서 강한 양성반응을 나타내다가 출생후 1일에는 수질에서는 관찰되지 않고 피질의 굵은오름부분과 치밀반에서만 국한되어 발현되었다. 4일에 치밀반의 염색성은 강해지는 반면 굵은오름부분에서는 중증도의 반응을 나타내다가, 7일에 처음으로 속수질에서 소수양성세포들이 관찰되기 시작하였다. 출생후 14일에는 속수질의 집합관에서도 중증도의 발현양상을 나타내다가 28일에 이르러서야 바깥수질의 가는내림부분에도 관찰되기 시작하여 성체와 비슷한 양상을 나타내었다.

세포자멸사의 조절인자로는 세포외부의 인자뿐 아니라 세포내의 인자가 매우 깊이 관련되어 있음이 알려져있다. B세포 림프종에서 발견된 암유전자인 bcl-2는 세포자멸사를 억제하며 (Hockenbery et al., 1990), 거의 모든 콩팥 종양에서 bcl-2가 발현된다. bcl-2 유전자 결핍 생쥐에서는 중증의 콩팥질환이 생기며 (Chandler et al., 1994), 또한 bcl-2 유전자 결핍 생쥐의 콩팥은 세포자멸사가 현저히 증가하여, 출생후에는 콩팥의 크기뿐 아니라 요세관의 숫자도 줄어들어, 콩팥의 종양 발생뿐 아니라 콩팥의 발생과정에서도 세포자멸사와 bcl-2가 밀접한 관계가 있음을 알게 되었다 (Sorenson et al., 1995). 성체에서 콩팥의 세포자멸사는 허혈 또는 여러 독성물질에 의한 손상뿐 아니라 고혈압과 당뇨에 관련된 콩팥질환에서도 증가되어 콩팥기능에 치명적인 손상을 가져오기도 한다. 그러나 그와는 반대로 표피성장인자를 비롯한 성장인자나 NO 등에 의해 세포자멸사가 감소한다는 보고도 있다. 한편 출생후 짧은헨레고리에서 긴헨레고리로의 성장과 형태형성을 위해서는 세포증식 (proliferation)이 필요하게 되며 그 부위는 요세관의 위치에 따라 좌우되기 보다는 바깥수질 부위에서 가장 활발하게 일어난다. 발생과정중에 thymidine 유사체를 투여하여 요세관별로 index를 계산해 본 결과 출생후 3일과 5일군에서 가장 활발하였으며 그 부위는 바깥수질의 근위세관 (proximal tubule)과 원위세관 (distal tubule)에서 가장 높았으나 근위세관에서가 다소 높게 나타났다 (19.1% : 14.9%, 출생후 3일 기준). 반면 수질부위의 내림가는부분과 오름가는부분에서는 거의 세포증식이 없는 것으로 관찰되었다 (0.6%, 출생후 3일 기준, 내림가는부분) (Cha et al., 2001). 이러한 사실은 실제적인 콩팥유두의 길이성장이 일어나는 수질부위에서는 세포자멸사가 발생하여 요세관이 소실되는 반면 세포의 증식은 바깥수질부분에서 일어나 길이성장의 실질적인 부분은 바깥수질에서 일어난다는 것을 알수 있다.

최근 Jiang (Jiang et al., 2004) 등에 의해 간질모델에서 niteric oxide가 dentate gyrus 부위의 세포증식을 증가시키는 것으로 보고 되었고, Hof (van't Hof et al., 2004) 등은 뼈에서 nitric oxide가 뼈의 중량과 부피를 증가시킴으로써 세포증식에 관여한다는 사실을 밝혔다. 특히 Poon (Poon et al., 2003) 등은 zebra fish에서 발생과정중에 nitric oxide가 발현되며 이들이 zebra fish의 발생과정에 중요한 역할을 함을 보고 하였다. 현재까지 콩팥에서는 세 종류의 NOS isoforms이 다양한 세포에서 발현된다고 보고되었다. NOS-1 단백질

은 치밀반에 강하게 발현되며, mRNA는 일부 신경과 수출세동맥 (efferent arterioles)에 발현된다. NOS-II와 NOS-III 또한 콩팥에서 발현되고 특히 NOS-III의 경우 내피세포에 주로 발현하여 콩팥의 vascular tone을 조절하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 치밀반에서의 nNOS의 tubuloglomerular feedback (TGF)를 조절하는 데 중요한 역할을 함이 밝혀졌다 (Welch et al., 2002). 이러한 기전에는 아직까지 이견이 존재하기는 하나 다음과 같이 세 가지 가설이 신빙성을 얻고 있다. 우선 첫째로 치밀반의 nNOS가 사이질을 통해 수출세동맥의 vasucular smooth muscle cell에 영향을 미쳐 guanylate cyclase를 활성화 시키고 cGMP를 생성한다는 설이다. 두 번째로는 치밀반의 nNOS가 autocrine action으로 굵은오름부분내의 Na/K/2Cl를 저해함으로써 TGF 반응을 유도한다는 주장이다. 마지막 세 번째는 NO가 juxtaglomerular apparatus (JGA)의 renin, adenosine, ATP 등 다른 인자들을 저해 시켜 TGF를 매개한다는 설이다. 하지만 아직까지 정확한 기전에 대해서는 보다 많은 연구가 필요한 실정이다. 한편 최근 이러한 nNOS의 TGF에 대한 효과와는 별개로 dentate gyrus에서의 세포증식효과와 위에서의 PCNA와의 상관관계에 대한 연구결과가 보고되면서 nNOS의 세포증식에 대한 효과가 관심을 모으고 있다 (Jiang et al., 2004). 콩팥에서도 nitic oxide의 기능과 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 그 분야는 주로 혈관확장 (vasodilation), 감염 (inflamation), nuero trasmission hormone release와 sodium handling 등에 국한되어 있고, 직접적인 세포증식과 사멸에 미치는 영향에 대한 결과는 없다. 본 연구에서는 발생중인 콩팥을 이용하여 분화중인 요세관에서 nNOS의 발현을 관찰하였으며, 발생과정중 nNOS는 분포양상이 성체에서와는 달리 모든부위에서 발현되지않고, 부위별로 피질, 속수질 그리고 바깥수질순으로 시기에 따라 발현되는 시작하는 부위가 다르며 특히 새로이 분화하는 굵은오름부분에 발현되었다가 성장해 감에 따라 발현이 감소함으로써 요세관의 분화와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Arnal JF, Munzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG: Interraction between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. J Clin Invest 95 : 2565-2572, 1995.

Bachmann S, Mundel P: Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization, and function. Am J Kidney Dis 24 : 112-119, 1994.

Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R: Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. Cardiovasc Res 41 : 773-780, 1999.

Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madsen KM, Kim J: Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. J Am Soc Nephrol 12(7) : 1410-1421, 2001.

Chandler D, el-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ: Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult humankidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. Hum Pathol 25(8) : 789-796, 1994.

Coles HS, Burne JF, Raff MC: Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. Development 118(3) : 777-784, 1993.

Ganger JP, Alberola AM, Salazar FJ, Nakamura T: Control of renal hemodynamics during intrarenal and systemic blockade of nitric oxide synthesis in conscious dogs. J Cardiovasc Pharmacol 20 : S160-S162, 1992.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348(6299) : 334-336, 1990.

Jiang W, Xiao L, Wang JC, Huang YG, Zhang X: Effects of nitric oxide on dentate gyrus cell proliferation after seizures induced by pentylenetrazol in the adult rat brain. Neurosci Lett 367(3) : 344-348, 2004.

Kim J, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM: Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. Am J Physiol 270(4 Pt 2) : F575-592, 1996.

Kim J, Lee GS, Tisher CC, Madsen K: Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop of Henle in rat kidney. Am J Physiol 271 : F831-F845, 1996.

Kone BC: Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. Semin Nephrol 19 : 230-241, 1999.

Poon KL, Richardson M, Lam CS, Khoo HE, Korzh V: Expression pattern of neuronal nitric oxide synthase in embryonic zebrafish. Gene Expr Patterns 3(4) : 463-466, 2003.

Solhaug MJ, Ballevre LD, Guignard J-P, Granger JP, Adelman RD : Nitric oxide in the developing kidney. Pediatr Nephrol 10 : 529-539, 1996.

Sorenson CM, Rogers SA, Korsmeyer SJ, Hammerman MR: Fulminant metanephric apoptosis and abnormal kidney development in bcl-2-deficient mice. Am J Physiol 268(1 Pt 2) : F73-81, 1995.

van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH: Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. Endocrinology 145(11) : 5068-5074, 2004.

Welch WJ, Wilcox CS: What is brain nitric oxide synthase doing in the kidney? Curr Opin Nephrol Hypertens 11(1) : 109-115, 2002.

＜국문초록＞

Nitric oxide는 콩팥에서 혈류의 조절, 사구체 혈액역동학 및

요세관의 운반에 중요한 역할을 하는 인자로서 최근 세포의 주기조절, 유사분열에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 연구결과에 의하면 발생중인 콩팥에서의 nNOS의 발현은 성체와는 다른 것으로 알려져 있으나, 발생중인 콩팥에서의 발현 양상 및 발현시기 등에 대해서 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 발생중인 콩팥을 이용하여 분화중인 요세관에서 nNOS의 발현양상을 관찰하고자 하였다. 성체에서 nNOS의 면역반응성은 사구체 보우만주머니의 벽측상피와 치밀반, 내림가는부분 및 수질집합관에 발현되었다. 발생중인 콩팥에서는 임신 15일에 처음 발현하기 시작하였으며, 그 부위는 원위세관의 굵은오름부분이었다. 임신 20일에서 출산후 14일까지 새로이 형성되는 요세관의 굵은오름부분에서 관찰되었으나, 분화를 마친 요세관에서는 그 발현 양상이 감소하였다. 출생후 21일경에는 최종적으로 치밀반에만 국한되어 발현되었다. 속수질에서는 내림가는 부분과 속수질 집합관에서 발현되었으며 그 양상은 수질 중간부위에서 강하게 발현되었으며 시작부위와 말단부위에서는 약하게 발현되었다. 이상의 결과로 보아 굵은오름부분에서의 nNOS의 발현은 요세관의 분화정도와 일치하며 특히 그 발현양상이 분화가 활발한 시기에 강하게 발현되고 분화가 저하된 후에는 발현이 감소하는 것으로 보아 발생중인 콩팥의 성장에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.