

Effect of Chronic Inhibition of Nitric Oxide on Blood Pressure and Apoptosis in the Blood Pressure-Associated with Organs

Hyung-Joon Bae[†]

Department of Laboratory, Georgia Medical Center, Doraville, GA, 30340, USA

Sprague-Dawley(SD) rats were orally administered with N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) which inhibits or blocks the production of nitric oxide from L-arginine in vascular endothelial cells and vessel tissue to statistically examine the effects of nitric oxide on some physiological changes such as blood pressure and heart rate, and to confirm the apoptosis induced by the suppressed nitric oxide activity in some related organs under light microscope. Systolic blood pressure significantly increased 28.5% by the chronic treatment of L-NAME for 8 weeks ($P<0.001$), no significant difference, however, was observed in heart rate between the control group and the L-NAME-treated group regardless of their age. Hematoxylin-eosin staining showed some histological alterations only in kidney among the examined organs; heart, liver, pancreas, and adrenal gland from the L-NAME-treated group. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) test showed a strong positive reaction, representing that the chronic treatment of L-NAME facilitates apoptosis, in the cortex and medulla of kidney, but not any significance detectable in the other organs. These results conclude that chronic treatment of L-NAME significantly increases blood pressure, and that the followed inhibition of nitric oxide synthesis occurs a typical inducement of apoptosis in kidney.

Key Words: L-NAME, Nitric oxide, Chronic inhibition, Blood pressure, Apoptosis, TUNEL test, PCNA

서 론

산화질소 (nitric oxide, NO)는 산화질소 합성효소인 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 혈관 내피세포에 산재해 있는 L-아르기닌에서 유래되는 생체 내에 널리 퍼져 있는 강력한 혈관확장물질이며 신경전달물질로서 반감기가 5~10초 정도로 매우 불안정한 기체 상태의 산소 자유기이다. 산화질소는 혈관 내피유도성 확장인자의 가장 중요한 물질로서 (Moncada and Higgs, 1995) 혈관 저항 및 혈관 긴장도에 대한 기능 (Busse et al., 1995), 코르티솔 생성 유발에 의한 고혈압 조절 (Kelly et al., 1998), 산화질소의 흡입에 의한 폐성 고혈압의 조절 (Yin et al., 2009) 등 주로 혈관을 확장시켜 혈압을 조절하는데 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 산화질소계와 고혈압의 관계를 규명하는 과정에서 L-NAME (N^G-nitro-L-arginine

methyl ester)가 산화질소 합성 억제제로 강력한 효과가 있음이 밝혀지면서 이에 대한 많은 연구가 진행되는 추세이다 (Bursztyн et al., 1997; Zou and Cowley, 1997; Erdely et al., 2006). Erdely 등 (2006)은 산화질소의 만성적인 억제는 고혈압과 밀접한 장기인 신장에서 만성신장질환 (CKD)을 야기할 수 있다고 보고하였다.

또한 산화질소는 신장의 사구체 간질세포를 포함한 여러 종류의 세포들에서 조직학적 변화인 세포자멸사를 일으킬 수 있다는 의견이 제시되었다 (Muhl et al., 1996). 세포자멸사 (apoptosis, programmed cell death, PCD)는 괴사와는 다르게 능동적이며 계획된 방법에 의한 세포사의 한 형태로 (Kerr, 1972) 중요한 생리학적 과정으로 생리적 조절이 불균형할 때, 암, 자가면역증, 신경변성 장애를 포함한 다양한 질병의 발병 원인으로 기여하는 현상으로서 (Hockenbery, 1995), 일련의 특징적인 형태적, 생화학적 변화에 의해 유도되는 유전적으로 암호화된 자살 프로그램에 따라 진행되며 (Susin et al., 1997), 카스파제의 활성화, 미토콘드리아성 탈분극, 세포의 양적 감소, 염색사 응축, 뉴클레오솜 DNA의 분절 등의 변화를 보인다 (Susin et al., 1997). 산화질소와 세포자멸사의 관련성을

*접수일: 2009년 10월 5일 / 수정일: 2009년 12월 16일
채택일: 2009년 12월 29일

[†]교신저자: 배형준, (우) 30340 미국 조지아주 도라빌시
조지아메디컬센터 진단검사의학과
e-mail: pbkor2009@gmail.com

보고하는 연구는 계속 이루어지고 있으며, 산화질소는 세포자멸사를 억제하는 기능 (Liu and Stamler, 1999)과 촉진하는 기능 (Brune et al., 1999)의 이중적인 성질을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 즉 간 (Kohl et al., 1999), 췌장의 B 세포 (Kaneto et al., 1995), 혈관 평활근세포 (Wang et al., 2007)를 포함하는 몇몇 세포주에서 산화질소가 세포자멸사를 유도하는 능력이 있음이 보고되고 있으나 사람의 B 림프구에서 내인성 iNOS이 발현되거나 소량의 산화질소 공여체에 노출되면 세포자멸사가 억제된다. 그러나 이들 대부분의 보고는 시험관내 (*in vitro*) 세포배양 상태에서 이루어진 실험이었으며, 체내 (*in vivo*) 상태에서의 산화질소와 세포자멸사와의 관계를 규명하고자 하는 연구는 매우 적은 실정이다.

증식세포핵 항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 DNA polymerase- δ 의 보조 단백질로서 증식 중의 세포에서 증가하는데 특히 세포분열의 합성기 동안 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으며 (Morris and Mathews, 1989), 최근에는 세포자멸사와 세포주기와의 관계 및 증식세포핵 항원에 대한 연구 (Gazitt and Erdos, 1994; Wang et al., 2007)가 활발하게 진행되고 있다. 또한 증식세포핵 항원과 산화질소 합성효소의 관계에 대해서도 많은 보고가 있으나, 아직까지 산화질소와 세포자멸사와의 관계에 대하여 확실한 이론이 정립되어 있지 않으므로 이 부분에 대하여 많은 연구가 계속 진행되고 있다.

본 연구는 흰쥐에 산화질소의 강력한 억제제인 L-NAME의 만성 투여가 생리학적 변화 지표인 혈압과 심박동에 미치는 영향을 조사하고, 혈압의 생성 및 조절기전과 밀접한 관련이 있는 신장, 심장, 간, 췌장 및 부신에서 체내 상태에서의 세포자멸사 증식세포핵 항원의 변화에 미치는 영향을 분석하고자 시도되었다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 동물은 체중 180~200 g에 달하는 7주령의 무균성 (SPF) 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rat)을 사용하였다. 모든 실험동물은 외부의 영향이 배제되고 실험에 적합한 환경, 즉 명암이 각각 12시간, 항온 (22~25°C) 및 항습 (60~70%) 조건 하에서 사료 및 음수를 자유로이 급식할 수 있는 조건을 갖춘 상태에서 사육하였다. 비교 실험을 위하여 실험군 (L-NAME 투여군)과 대조군 (L-NAME 비투여군)을 각각 5마리씩을 1개군으

로 하여, 실험군에는 음수에 상용화된 L-NAME (Sigma, Seoul, Korea)를 0.5 mg/ml의 비율로 용해시킨 후 급수병을 통하여 경구 투여하였으며, 대조군에는 L-NAME가 함유되어 있지 않은 음수를 동일량 투여하였다.

혈압 및 심박동수 측정

혈압은 수축기 혈압을 측정하였고, 혈압 및 심박동수는 electrophygmanometer와 pneumatic pulse transducer를 이용하는 indirect tail-cuff method로 측정하였으며, MK-1000 (Muromachi Kikai Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 측정기간은 실험군, 대조군 모두 투여 전과 투여 후 2주 간격으로 8주까지 총 5회에 걸쳐 측정하였고, 혈압 및 심박동수의 측정은 개체 당 5~6회 측정하여 그 평균값을 산출하였다.

조직적출 및 염색

실험동물을 에테르로 마취하여 양와위로 보정한 후 복측 정중선을 절개하여 심장, 신장 및 부신을 적출하였다. 적출된 장기를 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하였으며, 탈수 및 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4~5 μ m의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin을 실시하였다.

세포자멸사 검사

세포자멸사가 진행된 세포를 확인하기 위하여 ApopTag *in situ* apoptosis 검출 kit 페록시다아제 (Oncor Co., Gaithersburg, MD)를 사용하는 TUNEL test (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)을 시행하였다. 세포자멸사에 대한 염색 결과는 세포자멸사가 일어나고 있는 세포들에 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 간주하였으며, 양성 정도의 판독 기준은 장 등 (1997)의 방법을 변형하여 적용하였다.

면역조직화학 염색

파라핀 블록을 4~5 μ m 두께로 박절하여 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 ABC법으로 면역조직화학 염색을 실시하였다. 조직 내의 내인성 과산화효소를 비활성화시킨 다음, PCNA를 1:100으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시키거나 4°C에서 24시간 처리한 후 PBS로 5분간 3회 세척하였다. PCNA의 발색제는 0.005% DAB에 0.01% 과산화수소를 첨가하여 사용하였으며, 염색 결과의 판독은 핵이나 세포질에 진한 갈색 또는 황색으로 염색된 것

Table 1. Changes of systolic blood pressure and heart rate in L-NAME-treated SD rats

Time (weeks)	Systolic blood pressure (mmHg)		Heart rate (bpm)	
	Normal control	L-NAME-treated	Normal control	L-NAME-treated
0	120.8±9.3	117.4±8.9	412.4±39.9	412.8±13.6
2	144.2±10.0	167.4±20.6	411.2±67.4	361.8±26.3
4	157.8±6.1	181.6±15.4*	348.8±27.0	335.6±21.7
6	150.0±7.2	193.6±27.0**	347.6±25.8	345.4±19.8
8	155.0±9.3	199.2±9.1***	341.2±25.1	319.0±14.5

Values are mean ± SD, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs respective control group

Table 2. Apoptotic changes of renal cells in L-NAME-treated SD rats (H-E stain)

Organs	Normal control		L-NAME-treated							
			2 weeks		4 weeks		6 weeks		8 weeks	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
Kidney	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+++

H-E stain (Hematoxylin-eosin stain), C (cortex), M (medulla), - (negative), + (weak, 1~2 cells/field), ++ (moderate, 3~4 cells/field), +++ (strong, 5 or more cells/field)

을 양성으로 판독하였으며, 양성 정도의 판독 기준은 Chung 등 (1997)의 방법을 변형하여 적용하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 실험군과 정상 대조군과를 비교하기 위하여 2주마다 실험한 결과를 Student's *t*-test로 분석하였으며, 각 통계처리의 *P*값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

혈압 및 심박동수의 변화

산화질소 억제제인 L-NAME의 투여기간에 따른 수축기 혈압의 변화를 보면, 2주째에는 L-NAME 투여군이 167.4 ± 20.6 mmHg, 대조군이 144.2 ± 10.0 mmHg로 L-NAME 투여군이 16.1% (23.2 mmHg) 높았으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 4주째에는 L-NAME 투여군이 181.6 ± 15.4 mmHg, 대조군이 157.8 ± 6.1 mmHg로 L-NAME 투여군이 대조군에 비하여 15.1% (23.8 mmHg) 유의하게 높은 것으로 나타났고 ($P<0.05$), 6주째에는 L-NAME 투여군이 193.6 ± 27.0 mmHg, 대조군이 150.0 ± 7.2 mmHg로 L-NAME 투여군이 29.1% (43.6 mmHg) 유의하게 높았다 ($P<0.01$). 또한 마지막 8주째에는 L-NAME 투여군이 대조군에 비하여 28.5% (44.2 mmHg) 높은 것

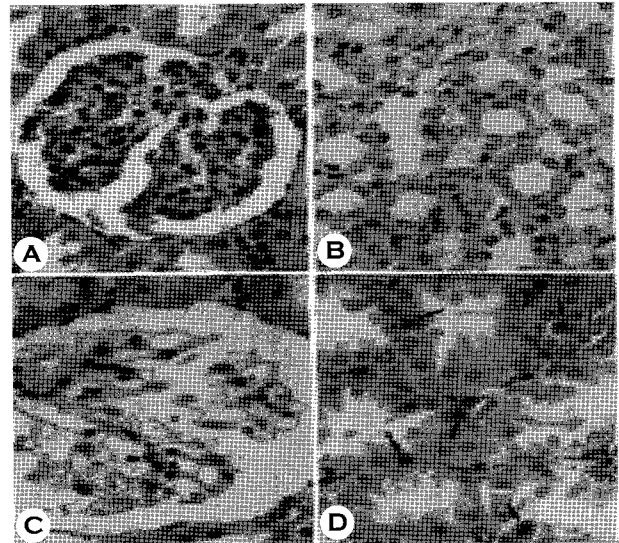


Fig. 1. Histological finding for kidney of L-NAME-treated SD rats (H-E stain). **A:** Renal cortex of normal control group. **B:** Renal medulla of normal control group. **C:** Renal cortex of L-NAME-treated group for 8 weeks. **D:** Renal medulla of L-NAME-treated group for 8 weeks. Apoptotic eosinophiles (red cells indicated by arrows) were observed in C and D. Light microscopy. $\times 400$.

으로 나타나 투여기간이 장기간 지속될수록 L-NAME 투여군의 혈압변화가 대조군에 비하여 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 그러나 L-NAME 투여기간에 따른 심박동수는 L-NAME 투여군과 대조군간에 유의한 차이가 발견되지 않았다.

H-E 염색의 양적 변화

신장의 H-E 염색 결과, 투여 8주 후에 피질 사구체 부분의 기저막이 얇아지고 위축되는 등의 변화가 일어났다. 또한 대조군과 L-NAME 투여 2주군까지는 수질과 피질 모두에서 세포자멸성 (apoptotic) 반응으로 여겨지는 세포자멸 세포 (apoptotic cell)가 관찰되지 않았으나 L-NAME 투여 4주째에는 수질 부위에서 핵농축과 세포질의 호산성화, 세포 주변부에서 농축된 핵, 그리고 세포자멸체 (apoptotic body) 등 세포자멸사 소견을 나타내는 세포들이 1+ 정도의 양성 반응으로 관찰되었다 (Table 2). 투여 6주째에는 이러한 세포자멸사 양상의 세포들이 사구체 혈관 내피세포, 세뇨관 상피세포, 그리고 간질세포 등 피질 (1+)과 수질 (2+) 부위에서 광범위하게 관찰되었으며, 마지막 8주째에는 현저하게 증가되는 양상 (피질: 1+, 수질: 3+)으로 지속되었다 (Fig. 1, Table 2). 그러나 심장, 간, 췌장 그리고 부신의 경우 모두에서 L-NAME 투여 후 8주군은 대조군에 비하여 뚜렷한 조직학적 변화는 관찰되지 않았다 (Table 3).

In situ labeling을 이용한 세포자멸사의 변화

TUNEL method를 이용하여 ApopTag에 의한 염색을 실시한 결과, 세포자멸체는 미만성 혹은 과립상으로 염색되었으며, 이들 중 핵과 세포자멸 세포가 과립상의 진한 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였다. 신장의 피질과 수질 부분에서 면역염색 반응을 관찰한 결과,

Table 3. Apoptotic changes of heart, liver, pancreas and adrenal gland in L-NAME-treated SD rats (H-E stain)

Organs	Normal control	L-NAME-treated
Heart	-	-
Liver	-	-
Pancreas	-	-
Adrenal gland	-	-

- (negative)

L-NAME를 투여하지 않은 대조군에서는 세포자멸사 양성 반응을 나타내는 세포가 관찰되지 않았다 (Table 4).

그러나 L-NAME 투여 2주째와 4주째에는 피질과 수질에서 모두 1+ 정도의 약한 양성 반응이 나타났으며, L-NAME 투여가 만성화될수록 TUNEL법에서 양성 반응이 강해져 마지막 8주째에서는 피질과 수질 부분 모두에서 3+ 정도의 강한 양성 반응을 보였다 (Fig. 2, Table 4). L-NAME 투여군의 췌장에서는 약한 양성 반응(1+)을 보였으나 대조군에서도 같은 정도의 반응을 보여 두 군간에 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다 (Table 5). 심근, 간 및 부신에서도 역시 양성 반응으로 간주할 만한 세포자멸사 소견을 보이지 않았다 (Table 5).

면역조직화학 염색의 양적 변화

TUNEL법의 대조 실험으로 증식세포핵 항원 (PCNA)

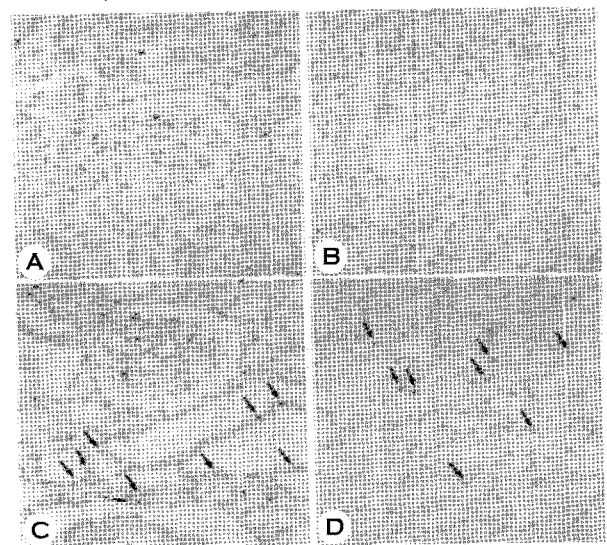


Fig. 2. Immunohistochemical stain against TUNEL in kidney of L-NAME-treated SD rats. **A:** Renal cortex of normal control group. **B:** Renal medulla of normal control group. **C:** Renal cortex L-NAME-treated group for 8 weeks. **D:** Renal medulla L-NAME-treated group for 8 weeks. Many apoptotic cells (dark brown cells indicated by arrows) were observed in C and D. Light microscopy. $\times 200$.

Table 4. Immunoreactivity against TUNEL and PCNA in kidney of L-NAME-treated SD rats

Items	Normal control		L-NAME-treated							
			2 weeks		4 weeks		6 weeks		8 weeks	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
TUNEL	-	-	+	+	+	+	+++	++	+++	+++
PCNA	+++	+++	+	+	++	++	+	+	+	+

C (cortex), M (medulla), - (negative), + (weak, TUNEL: 1~4 cells/field, PCNA: 1~2 cells/field), ++ (moderate, TUNEL: 5~9 cells/field, PCNA: 3~4 cells/field), +++ (strong, TUNEL: 10 cells or more/field, PCNA: 5 cells or more/field)

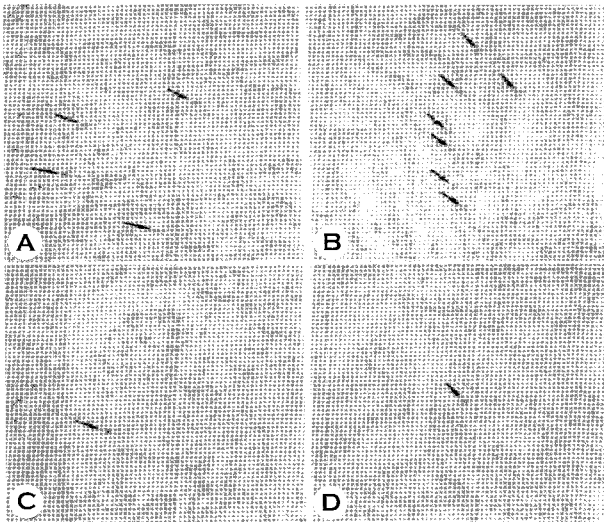


Fig. 3. Immunohistochemical stain against PCNA in kidney of L-NAME-treated SD rats. **A:** Renal cortex of normal control group. **B:** Renal medulla of normal control group. **C:** Renal cortex L-NAME-treated group for 8 weeks. **D:** Renal medulla L-NAME-treated group for 8 weeks. Proliferating cells (dark brown cells indicated by arrows) of PCNA were observed in C and D. Light microscopy. $\times 200$.

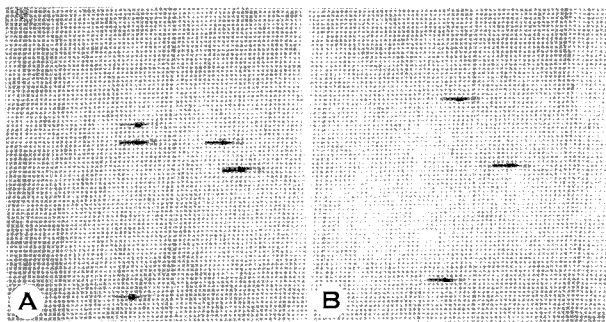


Fig. 4. Immunohistochemical stain against PCNA in pancreas of L-NAME-treated SD rats. **A:** Normal control group. **B:** L-NAME-treated group for 8 weeks. Proliferating cells (dark brown cells indicated by arrows) were observed in both groups. $\times 200$.

염색을 시행한 결과, L-NAME를 투여하지 않은 신장의 경우 대조군에서는 피질과 수질 모두에서 한 시야 당 5개 이상의 증식 세포들이 출현하는 강한 양성 반응 (3+)을 보였으며, L-NAME 투여 4주 째에 중등도의 양성 반응 (2+)을 보인 것을 제외하고는 2주, 6주 및 8주째 모두에서 피질과 수질 구별없이 약한 양성 반응 (1+)을 보였다 (Fig. 3, Table 4). 췌장의 경우에는 대조군에서는 3+, L-NAME 투여군에서는 2+의 양성 반응을 보였으며, 간과 부신에서는 대조군과 L-NAME 투여군 모두에서 증식 세포들이 1~2개 정도 출현하는 약한 반응 (1+)을 보여 L-NAME 투여 후 현저한 변화가 없는 것으로 나타났다

Table 5. Immunoreactivity against TUNEL and PCNA in heart, liver, pancreas and adrenal gland of L-NAME-treated SD rats

Organs	Normal control	L-NAME-treated
Heart	TUNEL	-
	PCNA	-
Liver	TUNEL	-
	PCNA	+
Pancreas	TUNEL	+
	PCNA	+++
Adrenal gland	TUNEL	-
	PCNA	+

- (negative), + (weak, TUNEL: 1~4 cells/field, PCNA: 1~2 cells/field), ++ (moderate, TUNEL: 5~9 cells/field, PCNA: 3~4 cells/field), +++ (strong, TUNEL: 10 cells or more/field, PCNA: 5 cells or more/field)

(Fig. 4, Table 5). 그러나 심장에서는 PCNA 염색에 대한 반응이 대조군과 L-NAME 투여군에서 전혀 나타나지 않았다 (Table 5).

고 찰

L-NAME는 강력한 산화질소 합성 억제제로서 산화질소의 급성 및 만성적 억제가 혈관수축을 일으켜 혈압을 상승시킨다고 보고된 이래 산화질소를 통한 고혈압의 발병기전에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다 (Jover et al., 1993; Burszty et al., 1997; Sigmon and Beierwaltes, 1998; Erdely et al., 2006; Olatunji and Soladoye, 2008). 고혈압의 정도는 산화질소 생산의 억제 정도에 비례하고, 병리생리학적 조건에서 혈관성 산화질소 생성의 진행성 소모는 혈압의 비례적인 증가에 의해 증명될 수 있으며, 또한 쥐에 L-NAME를 경구 투여한 후에 혈압의 유의하게 상승하여 L-NAME 투여군의 평균 혈압이 L-NAME를 투여하지 않은 대조군에 비하여 현저하게 높게 나타난다 (Ikeda et al., 1992; Olatunji and Soladoye, 2008). Ikeda 등 (1992)은 정상 혈압을 갖는 쥐에게 L-NAME를 8주간 장기간 경구 투여한 결과, 초기에 혈압이 급격하게 상승하였고, 투여 후 1, 2, 4주째까지 대조군에 비하여 점진적이고 뚜렷한 상승을 보인다고 하였다. 또한 Arnal 등 (1992)과 Baylis 등 (1992)도 만성적인 L-NAME 투여에 의해 고혈압이 시간 의존적으로 유발된다고 하였으며, Olatunji와 Soladoye (2008)은 L-NAME가 함유된 음수를 쥐에 장기간 투여할 경우, L-NAME의 농도에 따라 혈압과 체액의 균형이 용량 의존성으로 증가하는 경향을 보인다고

하였다. 본 연구에서도 L-NAME를 8주간 장기적으로 경구 투여한 결과, 투여기간이 증가할수록 혈압이 유의하게 증가하는 것으로 나타나는데 이는 L-NAME 투여에 의한 산화질소 합성의 억제는 발달 단계에 있는 young group의 혈압에 큰 영향을 미칠 수 있음을 시사하고 있다.

Lantheleme 등 (1994)은 쥐에 L-NAME를 4주간 경구 투여한 결과, 평균 혈압은 L-NAME 투여군이 정상 대조군에 비하여 현저하게 높은 반면, 심박동수, 체중, 총 심장 중량 및 좌심실 중량에서 L-NAME 투여군과 정상 대조군 사이에 유의한 차이가 없으며, 고혈압이 유발되었다고 해서 반드시 심장 비대가 동반되는 것은 아니라고 보고하여 혈압 상승과 심박동수의 상관관계가 낮음을 시사하였다. 또한 Lin 등 (1997)은 선천성 고혈압 쥐의 꼬리 정맥에 인간에서 추출한 내인성 산화질소 합성 효소를 주입한 결과 6~7주의 장기간에 걸쳐 체계적으로 혈압이 감소되었으며, 이러한 결과로 산화질소의 합성 여부가 혈압과 밀접한 상관성이 있는 것을 증명하였다. 그러나 심박동수와 체중에 있어서는 산화질소 합성효소의 주입 전·후에 상관관계가 낮음을 보고하였다. 본 연구에서도 혈압과 심박동수의 상관계수가 매우 낮은 것으로 나타나 ($r=0.396$), 위의 연구결과들과 일치하였다.

세포의 죽음에는 크게 두 가지 종류가 있는데 조직 손상에 의한 괴사와 능동적인 방법에 의한 세포자멸사가 있다 (Cotran et al., 1994). 괴사의 특징은 저산소증이나 독물 등에 의하여 DNA가 파괴되고 ATP가 감소되며 세포막이 손상 받는 것으로서 이로 인해 세포가 집단으로 종창되고, 세포질 내 소기관이 파괴되어 응고 괴사의 형태를 나타내게 되며 주위에 염증 반응을 동반하게 된다. 이러한 괴사의 특징에 비해 세포자멸사의 경우에는 생리적, 병리적 자극에 의하여 엔도뉴클리아제가 활성화되고 DNA가 분절화되어 주로 한 개의 세포들에서 세포자멸체 (apoptotic body)를 형성하여 탐식되는 과정을 거친다. 즉 세포자멸사는 세포의 정상 발달 단계에서 세포의 증식과 함께 독특한 생화학적, 구조적 현상에 의해 일어나는 현상으로서 용해성 또는 괴사성 세포 죽음과 구별되는 생리학적으로 필수적인 기전이다 (Cotran et al., 1994).

본 연구 결과, 산화질소의 만성적인 억제에 의해 고혈압과 가장 밀접한 장기인 신장에서 가장 큰 변화를 보이는 것으로 보였으며, 특히 신장의 수질 부분에서 더 심하게 변화되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 Erdely 등 (2006)의 결과와 일치하는 바, Erdely 등 (2006)은 L-NAME 투여에 의한 산화질소의 만성적인 억제는 혈압

을 유의하게 증가시켰으며, 특히 L-NAME의 장기 투여에 의해 신장의 수질 부분에서 더 심한 변화가 나타난다고 하였다.

세포자멸사를 검출하는 방법은 여러 가지가 있다. 수지로 포매된 조직 절편에 농축되어 있는 염색질과 정상 염색질의 염색 강도의 차이를 이용하여 세포자멸체를 검출하는 방법 (English et al., 1989), Bouin 액에 고정된 조직을 이용하여 Feulgen 염색을 하는 방법 (Goldberg et al., 1990), 톨루이딘 블루와 사프라닌으로 대조 염색하는 방법 (Martin-Partido et al., 1986) 등이 있으나 이는 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에는 적용하기 어려운 문제점을 가지고 있다. 이러한 기존의 세포자멸사에 대한 광학현미경적인 관찰은 그 크기가 작고 침윤한 림프구와의 감별이 어려운 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 최근에는 면역조직화학적 방법에 의해 파라핀에 포매된 조직 절편으로 세포자멸체를 검출할 수 있는 특수 염색법이 개발되었고, *in situ* end-labeling (ISEL) 법이나 (Wijsman et al., 1993), 본 연구에서 사용한 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling (TUNEL) 방법 (Thomas et al., 1998) 등을 이용하여 보다 정확하게 세포자멸사를 검색할 수 있게 되었다.

본 연구에서는 TUNEL법에 의한 광학현미경적 소견상 진한 갈색으로 염색되는 다수의 세포자멸 세포 또는 세포자멸체를 볼 수 있었으며, 특히 L-NAME 투여 2주째에는 그 변화를 보이지 않다가 4주 이후부터 세포자멸체의 수가 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 세포자멸사는 조직학적으로 여러 단계로 진행되는 데 자극이 있어도 세포에는 어떠한 조직학적인 변화도 일어나지 않는 시기가 존재하며 이 시기는 조직의 종류와 자극의 종류에 따라 서로 다르게 나타나기 때문인 것으로 알려졌다 (Bursh et al., 1985).

증식세포핵 항원 (PCNA)은 Miyachi 등 (1978)이 전신성 홍반성 루푸스 환자의 혈청에서 자가항체를 이용하여 처음 발견한 단백질로 DNA 복제시기 때 증가하며, 세포주기 중 특히 합성기 동안에 현저하게 증가하는 36 kD의 핵 단백질로서, 증식하지 않은 세포에서는 관찰되지 않으나 증식하는 세포에서는 증가하는 DNA polymerase- δ 에 대한 보조 단백질이다 (Gazitt and Erdos, 1994).

본 연구에서 산화질소 합성의 억제와 세포자멸사와 세포 증식과의 관계를 보기 위하여 PCNA 염색을 시행한 결과, L-NAME를 투여하지 않은 대조군의 신장에서는 강

한 양성 반응을 보였으며 8주째까지 지속되었다. 이는 암세포에서 세포자멸사가 일어나는 동안에 증식세포핵 항원 반응도 증가한다는 보고 (Gazitt and Erdos, 1994)와는 달리, 세포의 증식과 사멸 사이에 수적인 평형이 유지되고 있다가 어떤 원인에 의해 세포의 증식력이 증가하거나 사멸이 감소하면 세포의 수가 증가하여 종양을 형성할 수 있으며, 세포의 증식과 사멸 사이에 역동적인 관계가 있다는 Jang 등 (1998) 및 Wang 등 (2007)의 보고와 일치하여, 산화질소 합성 억제제인 L-NAME는 세포자멸사가 진행되는 동안에 증식세포핵 항원 반응을 감소시키는 것으로 사료된다.

본 연구는 산화질소의 만성적인 억제를 통한 산화질소와 고혈압과의 관련성, 그리고 산화질소의 활성화와 세포자멸사의 상관관계 규명 등을 통해 산화질소의 활성이 혈압 조절 및 혈압과 관련된 장기의 기능을 생리학적 및 조직학적으로 조절하는데 상당한 역할을 수행함이 제시되었으며, 최근 들어 세포자멸사의 원인을 또 다른 방법으로 규명하기 위하여 세포자멸사를 조절하는 여러 유전자들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 바 이와 관련된 연구를 진행할 필요성을 가지게 되었다.

REFERENCES

- Amal JF, Warin L, Michel JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992. 90: 647-652.
- Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 1992. 90: 278-281.
- Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide (NO): an effect of apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999. 6: 969-975.
- Bursh W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death(apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Arch Cell Pathol.* 1985. 50: 153-166.
- Bursztyn M, Raz I, Meker J, Ishay BD. Effect of acute N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) hypertension on glucose tolerance, insulin levels, and [³H]-deoxyglucose muscle uptake. *Am J Hypertens.* 1997. 10(6): 683-686.
- Busse R, Fleming I, Schini VB. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and function implications *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995. 35: 7-18.
- Chung M-J, Jang K-Y, Kang M-J, Lee D-G, Oh B-C. Expression of apoptosis, bcl-2, and PCNA in uterine cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Kor J Pathol.* 1997. 31(10): 1180-1189.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease.* Pathologic basis of disease. 1994. pp. 17-21. WB Saunders Co. Philadelphia, USA.
- English HF, Kyprianou N, Isaacs JT. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate.* 1989. 15: 233-250.
- Erdely A, Freshour G, Baylis C. Resistance to renal damage by chronic nitric oxide synthase inhibition in the Wistar-Furth rat. *Am J Physiol Intergr Comp Physiol.* 2006. 290(1): R66-72.
- Gazitt Y, Erdos GW. Fluctuations and ultrastructural localization of oncoproteins and cell cycle regulatory proteins during growth and apoptosis of synchronized AGF cells. *Cancer Res.* 1994. 54: 950-956.
- Goldberg MT, Tackaberry LE, Hardy MH, Noseworthy JH. Nuclear aberrations in hair follicle cells of patients receiving cyclophosphamide. *Arch Toxicol.* 1990. 64: 116-121.
- Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 1995. 146: 16-19.
- Ikeda K, Jr Gutierrez OG, Yamori Y. Dietary N^G-nitro-L-arginine induces sustained hypertension in normotensive Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992. 19(8): 583-586.
- Jang TJ, Jung W-H, Lee K-G. The relation between cell proliferation and apoptosis according to the histologic types in chemically induced rat mammary tumorigenesis. *Kor J Pathol.* 1998. 32(3): 174-185.
- Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1993. 21: 944-948.
- Kaneto H, Jujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T, Taniguchi N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 1995. 44: 733-738.
- Kelly JJ, Tam SH, Williamson PM, Lawson J, Whitworth JA. The nitric oxide system and cortisol-induced hypertension in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998. 25(11): 945-946.
- Kerr JFR. Some lysosome functions in liver cells reacting to sublethal injury. In: Dingle JT, Fell HB eds. *Lysosomes in biology and pathology.* 1972. pp. 126-142. North-Holland. Amsterdam, Denmark.
- Kohl V, Seizner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endo-

- thelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*. 1999. 67: 1099-1105.
- Lantheleme P, Lo M, Sassard J. Decreased cardiac baroreflex sensitivity is not due to cardiac hypertrophy in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *J Hypertens*. 1994. 12(7): 791-795.
- Lin KF, Chao L, Chao J. Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension*. 1997. 30(3): 307-313.
- Liu L, Stamler JS. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ*. 1999. 6: 937-942.
- Martin-Partido G, Alvarez IS, Rodriguez-Gallardo L, Navascues J. Differential staining of dead and dying embryonic cells with a simple new technique. *J Microsc*. 1986. 142: 101-106.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol*. 1978. 121: 2228-2234.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*. 1995. 9: 1319-1330.
- Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem*. 1989. 264: 13856-13864.
- Muhl H, Sandau K, Brune B, Briner VA, Pfeilschifter J. Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 1996. 317: 137-149.
- Olatunji LA, Soladove AO. Oral contraceptive administration aggravates nitric oxide synthesis inhibition-induced high blood pressure in female rats. 2008. *Pathophysiology*. 15(4): 221-226.
- Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension*. 1998. 31: 649-656.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer Reed. The central execution of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95 and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1997. 186: 25-37.
- Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. 1998. *Nephrol Dial Transplant*. 13(9): 2216-2226.
- Wang YF, Tian H, Tang CS, Jin HF, Du JB. Nitric oxide modulates hypoxic pulmonary smooth muscle cell proliferation and apoptosis by regulating carbon monoxide pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2007. 28(1): 28-35.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De velde CJH, Cornelisse CJ, Van dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*. 1993. 41: 7-12.
- Yin N, Kaestle S, Yin J, Hentschel T, Pries AR, Kuppe H, Kuebler WM. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. 2009. *Crit Care Med* 37(3): 980-986.
- Zou AP, Jr Cowely AW. Nitric oxide in renal cortex and medulla: an *in vivo* microdialysis study. *Hypertension*. 1997. 29(2): 194-198.