

일측성 요로폐쇄 흰쥐 신장에서 암모니아 운반체의 발현

충북대학교 의과대학 ¹내과학교실, 의학연구소, ²진단검사의학과교실, ³충북대학교 약학대학 임상약학실

김승중¹ · 김혜영¹ · 최재현¹ · 이동화¹ · 김경민¹ · 김선문¹ · 권순길¹ · 신경섭² · 김경숙³

Renal Expression of an Ammonia Transporter in Rats with a Unilateral Ureteral Obstruction

Seung Jung Kim¹, Hye-Young Kim¹, Jae Hyun Choi¹, Dong Hwa Lee¹, Kyung Min Kim¹, Sun Moon Kim¹, Soon Kil Kwon¹, Kyung Sub Shin², and Kyung Sook Kim³

Departments of ¹Internal Medicine, Medical Research Institute and ²Laboratory Medicine, Chungbuk National University College of Medicine; ³Clinical Pharmacy, Chungbuk National University College of Pharmacy, Cheongju, Korea

Background/Aims: Urinary tract obstruction induces a form of renal tubular acidosis with a urinary acidification defect caused by decreasing net acid excretion, which is predominantly due to a decrease in urinary ammonia excretion. The present study examined whether this decrease is associated with changes in the renal expression of an ammonia transporter family member, Rh C glycoprotein (Rhcg), in rats with a unilateral ureteral obstruction.

Methods: Male Sprague-Dawley rats underwent a 24-h unilateral ureteral obstruction. Rhcg expression was then evaluated by immunoblotting and immunohistochemistry. Cell height, total cellular expression, expression in the apical 25% of the cell, and % of total expression in the apical region were quantified by immunohistochemistry with quantitative morphometric analysis.

Results: After 24 h of unilateral ureteral obstruction, the serum bicarbonate level and total urinary ammonia excretion were decreased. Both light microscopy and immunohistochemistry with quantitative morphometric analysis demonstrated that the total intensity of Rhcg expression was decreased in the obstructed kidneys, whereas Rhcg expression did not change in the cortical collecting duct (CCD) and outer medullary collecting duct (OMCD) of nonobstructed kidneys in rats with a 24-h unilateral ureteral obstruction.

Conclusions: The rats with a unilateral ureteral obstruction showed decreased urinary ammonia excretion associated with decreased Rhcg expression in the CCD and OMCD. These changes suggest that the ammonia transporter Rhcg mediates a urinary acidification defect associated with unilateral ureteral obstruction. (Korean J Med 2014;86:444-452)

Keywords: Ureteral obstruction; Acidosis; Ammonia; Kidney tubules; Collecting

Received: 2013. 6. 11

Revised: 2013. 7. 8

Accepted: 2013. 8. 19

Correspondence to Hye-Young Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Chungbuk National University College of Medicine and Medical Research Institute, 776 1sunhwan-ro, Heungdeok-gu, Cheongju 361-711, Korea

Tel: +82-43-269-6017, Fax: +82-43-273-3252, E-mail: hyekim@chungbuk.ac.kr

*The work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2010-0025199).

Copyright © 2014 The Korean Association of Internal Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

요로폐쇄(urinary tract obstruction)는 요산성화 장애가 동반되며 신세뇨관산증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 세뇨관산증은 신세뇨관을 통한 산의 배설이 감소하여 만성 대사성 산증이 야기된 경우이며 요 암모니움 배설이 감소하는 대표적인 질환이다[1,2].

신장에서 산의 배설은 총 산배설량의 60-70%를 차지하고 생리적 요구량에 따라 크게 변동될 수 있는 암모니움 이온 (NH_4^+)을 통한 배설이 가장 중요하다[3,4]. 암모니아 운반체(ammonia transporter)인 Rh B Glycoprotein (Rhbg)과 Rh C Glycoprotein (Rhcg)은 신장에서 암모니아 배설의 중요한 역할을 하는 집합관과 연결세관에서 주로 발현됨이 보고되고 있으며[5-8], 요중 암모니아 배설 변화에 따라 암모니아 운반체인 Rhcg의 발현 변화가 동반되어[9-11], 신장의 암모니아 배설에 있어서 암모니아 운반체 Rhcg의 중요성이 부각되고 있다.

본 연구는 일측성 요로폐쇄 모델에서 요 암모니아 배설량과 암모니아 운반체의 발현 변화를 확인하여 요로폐쇄의 요산성화 장애에 있어서 암모니아 운반체의 역할을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 Sprague-Dawley rat에 일측성 요로폐쇄를 24시간 유발하여 생리학적 평가지표와 반정량적 immunoblot을 시행하였고 면역조직화학염색을 시행 후 정량화하였다.

대상 및 방법

실험동물

실험동물은 200-250 g 사이의 웅성 Sprague-Dawley 계 흰쥐(대한바이오링크, Chungbuk, Korea)를 사용하였다. 실험쥐를 정상 대조군과 실험군인 일측성 요로폐쇄군으로 구분한 후 무작위로 각각 6마리씩을 선정하였다. 요로폐쇄는 좌측 요로 중간부위를 노출한 후 4 mm polyethylene tube를 두고 4.0 silk로 결찰하여 24시간 동안 유발시켰다. 정상 대조군은 같은 방법으로 수술하되 요로결찰을 시행하지 않은 sham 수술군으로 하였다.

소변 및 혈액 채취와 분석

24시간 소변은 신장 적출 전 1일간 대사케이지(metabolic cage)에 두고 mineral oil을 처리하여 채취하고 혈액은 신장 적출 직전에 대동맥으로부터 채취하여 원심분리 후 -80°C에 보관하였다.

신장 적출 전에 수집한 혈청 Na^+ , K^+ , Cl^- , tCO_2 의 농도와 요 Na^+ , K^+ , Cl^- 의 농도는 Nova Stat Profile M critical care analyzer (Nova Biomedical Co., Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 요 pH는 pH meter (Orion 3 star plus, Thermo, Beverly, MA, USA)를 사용하였고 요중 암모니아 농도는 상용화된 제품을 이용하여 측정하였다(Sigma Ammonia Assay Kit, Sigma-Aldrich Corp, St, Louis, MO, USA).

신장조직의 처리

동물실험이 종료되는 시점에서 실험군과 대조군의 신장을 적출하였다. 신장을 얻기 전에 대동맥을 통해 phosphate-buffered saline (PBS)을 관류시켜 혈액을 제거한 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장은 반정량적 immunoblotting을 위하여 수질과 피질을 분리한 다음 액화질소용액에서 급속 냉각시킨 후 -80°C 냉동고에 보관하였다. 면역조직화학법을 위해서는 적출한 신장을 획단면으로 자른 후 8% periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solution에 밤새 고정하였다.

반정량적 immunoblotting법

검체의 준비

냉각된 조직을 칼로 잘게 조각낸 다음 protein extraction solution (PRO-PREP, Intron, seongnam, Kyungki, Korea)을 조직 10 mg당 600 μL 를 넣고 tissue homogenizer (Polytron PT MR2100; Kinematica, AG, Switzerland)로 15,000 rpm 10초씩 3번 균질화 하였다. 균질화된 용액을 -20°C 냉동고에서 30분 동안 조직을 용해시킨 후 13,000 rpm centrifuge (Hanil science industrial, Incheon, Korea)한 후 상등액을 취하였다. 단백질 추출액을 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 하였으며 Bradford 방법으로 595 nm 파장에서 분광광도계로 측정하여 단백량을 정량하였다.

전기영동 및 immunoblotting

각 검체들을 10% polyacrylamide-SDS mini gel에 전기영동 (SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)하고 electroelution법을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P Membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)에 200 mA로 4시간

30분 동안 transfer (TE 22 tank transfer unit; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)시켰다. PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 tris-buffered saline-0.1% tween20 (TBS-T)에 용해시켜 2시간 동안 처리한 다음, TBS-T로 간단히 세척하고 일차항체를 TBS-T에 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 PVDF membrane을 TBS-T로 10분간 4회 세척하였다. 이차 항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1:5,000로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 10분간 4회 세척하였다.

반응이 모두 끝난 PVDF membrane을 West-Zol plus (Intron, seongnam, Kyungki, Korea)의 용액 A와 B를 1:1로 섞어 PVDF membrane에 반응시킨 후 이를 LAS-3000 imaging system (Fujipilm life scince, Minato-ku, Tokyo)에 노출시켜 image capture하였다. Capture한 image를 Multi Gauge V3.1 프로그램을 사용하여 band-densitometry를 측정하고 이를 대조군 평균치에 100%에 대한 상대값으로 표시하였다.

일차항체/

Rhcg에 대한 일차항체는 Interdisciplinary center for Biotechnology Research, University of Florida College of Medicine에서 제작한 rabbit polyclonal antibody를 사용하였다. Vacuolar H⁺-ATPase rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하고, loading control로 Monoclonal Anti-β-Actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

면역조직화학염색법

면역조직화학염색법은 PLP 용액에 고정된 신장조직을 신장유두를 중심으로 중심부위를 2 mm 두께로 자른 후 paraffin block에 포매하였다. 포매된 신장 절편을 microtome을 이용하여 4 μm의 절편을 슬라이드를 제작하여 면역조직화학염색을 시행하였다. Xylene을 사용하여 절편을 탈파라핀시키고 에탄올 농도를 100%부터 70%까지 점진적으로 낮추면서 재수화시킨다. 내재성 Peroxidase 활성을 제거하기 위하여 3% H₂O₂로 4°C 냉장고에서 45분간 반응시켰다. PBS로 세척 후 조직 내 비특이적인 면역 반응을 제거하기 위해 PBS에 희석한 염소혈청(normal goat serum; Vector Laboratories, inc. Burlingame, CA, USA)을 4°C 냉장고에서 30분간 반응시켰다. PBS에 희석한 일차항체를 4°C 냉장고에서 밤새 반응시키고 PBS로 일차항체를 세척 후 PBS에 희석한 이차항체 biotinylated goat anti-rabbit IgG (MACH 2 Rabbit HRP Polymer;

Biocare medical, california, USA)를 30분간 상온에서 반응시켰다. PBS로 세척 후 peroxidase 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) substrate kit에 반응시켰다. 중류수로 peroxidase 반응을 정지시킨 후 에탄올과 xylene으로 탈수시킨 후 permount로 봉입하였다.

면역조직화학염색법의 정량적 분석

원위세관의 세포 분자수준에서 Rhcg의 발현 변화를 확인하기 위하여 NIH image J, V1.34s 프로그램을 이용하여 면역조직화학법을 정량화하였으며 이전 연구의 방법에 근거하여 시행하였다[10]. 면역조직화학염색 후 광학현미경으로 각 실험군에서 피질과 수질 집합관 다섯 개를 임의선정하고 사이세포를 각 3개 세포씩 사진 촬영하였다. 세포내장으로부터 기저외측세포막까지 일직선으로 그어 거리에 따른 pixel intensity를 측정하고 이 값은 컴퓨터 프로그램에서 변환하여 세포 크기, 총 Rhcg intensity, 자유면세포막 Rhcg의 발현 비율을 계산하였다. 자유면세포막은 세포내강부터 25%까지로 선정하여 자유면세포막 Rhcg의 발현으로 분석하였다. 정량화된 값은 동물군별로 통계 분석하였다.

통계 분석

실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 실험군과 대조군 간 차이에 대한 통계적 유의성 분석은 T-검정법 (SigmaPlot version 12.0; Systat Software Inc, San Jose, CA)으로 분석하였으며 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

소변 및 혈액검사 결과

실험군은 일측성 요로폐쇄을 유발하기 위하여 좌측 요로를 24시간 동안 결찰하였다. 혈중 Na⁺, K⁺, Cl⁻ 농도는 대조군과 실험군에서 차이가 없었다. 혈중 tCO₂ 농도는 대조군 27.5 ± 2.8 mEq/L에 비하여 실험군은 25.2 ± 1.0 mEq/L로 감소하였다($p < 0.05$, Table 1). 24시간 요 암모니아 배설은 대조군 0.38 ± 0.08 mmol에 비하여 실험군에서 0.19 ± 0.03 mmol로 요 암모니아 배설이 감소하였으며($p < 0.05$), Urine pH는 대조군 7.83 ± 0.65에 비하여 실험군에서 8.51 ± 0.34로 양군 간에 차이가 없어 일측성 요로폐쇄에 의해 신세뇨관산증이 유발되었음을 확인하였다. 사구체 여과율은 대조군 0.76 ±

Table 1. Serum chemistries and electrolytes in rats with unilateral ureteral obstruction

	Control (n = 6)	UUO (n = 6)
Na ⁺ (mmol/L)	145.2 ± 6.5	147.4 ± 4.2
K ⁺ (mmol/L)	3.80 ± 0.57	3.72 ± 0.71
Cl ⁻ (mmol/L)	99.4 ± 4.1	98.7 ± 4.5
tCO ₂ (mEq/L)	27.5 ± 2.8	25.2 ± 1.0 ^a
Cr (mg/dL)	0.41 ± 0.04	0.53 ± 0.15

Values are mean ± SD. n = number of rats.

UUO, unilateral ureteral obstruction; tCO₂, total CO₂; Cr, creatinine.

^ap < 0.05, p < 0.05: UUO vs. Control.

Table 2. Urine parameters in rats with unilateral ureteral obstruction

	Control (n = 6)	UUO (n = 6)
Ammonia (mmol/24 h)	0.38 ± 0.08	0.19 ± 0.03 ^a
Urine PH	7.83 ± 0.65	8.51 ± 0.34
Body weight (g)	291.5 ± 43.7	279.7 ± 47.1
Clcr (mL · min ⁻¹ · 100 g ⁻¹)	0.76 ± 0.14	0.51 ± 0.20 ^a
Ammonia/Clcr (μmol/min)	12.2 ± 3.57	15.0 ± 10.4
Uv (μL · min ⁻¹ · kg ⁻¹)	13.6 ± 0.64	16.7 ± 0.42
U _{Na} · Uv (μmol/min)	153.6 ± 27.8	118.8 ± 17.2
U _K · Uv (μmol/min)	294.0 ± 40.4	259.0 ± 56.1
U _{Cl} · Uv (μmol/min)	241.1 ± 47.9	196.5 ± 32.1

Values are mean ± SD. n = number of rats.

UUO, unilateral ureteral obstruction; Clcr, creatinine clearance; Uv, urinary volume; U_{Na}, urinary sodium; U_K, urinary potassium; U_{Cl}, urinary chloride.

^ap < 0.05: UUO vs. Control.

0.14 mL · min⁻¹ · 100 g⁻¹에 비하여 실험군은 0.51 ± 0.20 mL · min⁻¹ · 100 g⁻¹로 감소하였다(p < 0.05, Table 2). 사구체여과율로 보정한 암모니아 배설량은 대조군 12.2 ± 3.57 μmol/min에 비하여 실험군은 15.0 ± 10.4 μmol/min로 유의한 차이가 없었다. 소변량은 대조군 13.6 ± 0.64 μL · min⁻¹ · kg⁻¹에 비하여 실험군에서 16.7 ± 0.42 μL · min⁻¹ · kg⁻¹으로 유의한 차이는 없었으며 요 Na⁺ K⁺, Cl⁻은 실험군에서 감소하는 경향을 보였으나 양군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

반정량적 Rhcg immunoblotting 결과

대조군과 실험군에서 콩팥 피질과 수질부의 암모니아 운반체인 Rhcg 단백 발현은 양군 간에 유의한 차이가 없었

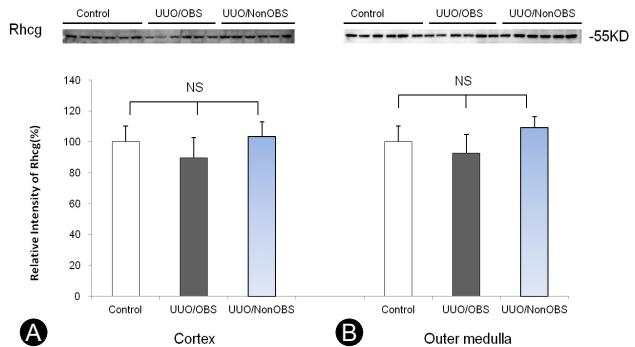


Figure 1. Rhcg protein expression in response to unilateral ureteral obstruction (UUO). (A) and (B) immunoblotting for Rhcg from the renal cortex and outer medulla of control, obstructed (UUO/OBS), and nonobstructed (UUO/NonOBS) kidneys with a unilateral ureteral obstruction. Each lane was loaded with a sample from a different animal. Mean densitometries from the cortex and outer medulla are shown; the band density is relative to the mean (100%) expression in control kidneys. There were no significant differences between the UUO and controls in Rhcg protein expression.

The data are presented as the mean ± SD; n = 6 per group. NS, not significant.

다(Fig. 1).

Rhcg 및 H⁺-ATPase에 대한 면역조직화학염색 결과

면역조직화학염색 결과 Rhcg는 피질과 수질 집합관의 A형 사이세포의 자유면세포막에 주로 발현되었으며 기저외측세포막에는 상대적으로 약하게 발현되었다. 실험군에서 Rhcg 면역반응성은 비폐쇄부위 콩팥의 피질과 수질 집합관에서는 대조군과 차이가 없었으나 폐쇄부위 콩팥의 피질과 수질 집합관에서는 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 2). Rhbg는 피질과 수질 집합관의 A형 사이세포의 기저외측세포막에 강하게 발현되었으며 실험군의 Rhbg 면역반응성은 대조군에 비하여 유의한 차이는 없었다. A형 사이세포의 자유면세포막에 존재하는 것으로 알려진 H⁺-ATPase의 면역반응성은 실험군에서 비폐쇄부위 콩팥의 피질과 수질 집합관에서는 대조군과 차이가 없었으나 폐쇄부위 콩팥의 피질과 수질 집합관에서는 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 3).

Rhcg 면역조직화학염색의 정량적 분석 결과

면역조직화학염색에서 확인한 Rhcg 발현 변화를 정량화하기 위하여 NIH image J, V1.34s 프로그램을 이용하였고 이 값을 대조군 평균치 100%에 대한 상대값으로 표시하였다.

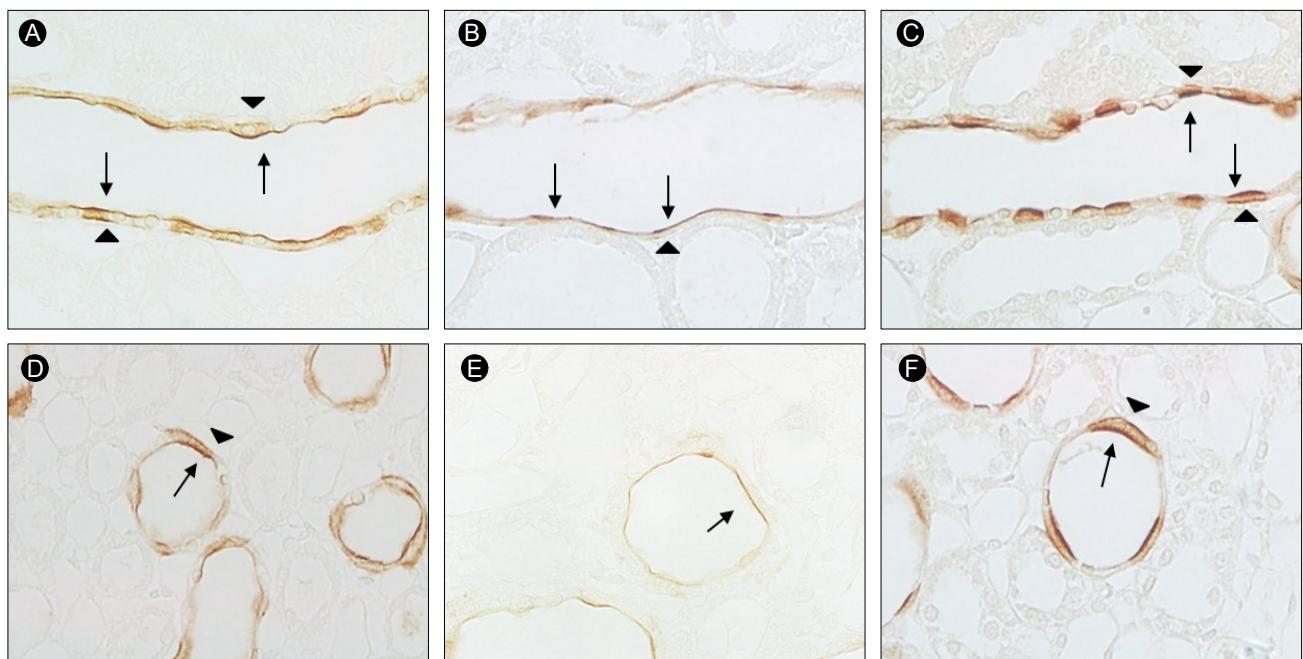


Figure 2. Rhcg immunoreactivity in the cortical collecting duct (CCD) and outer medullary collecting duct (OMCD) of control, obstructed, and nonobstructed kidneys with a unilateral ureteral obstruction (UUO). The intercalated cells exhibited a broad apical band of intense Rhcg immunoreactivity (black arrow); basolateral immunoreactivity (black arrowhead) was noted as a weaker, thinner band compared with the apical Rhcg immunoreactivity. Rhcg expression was reduced in those regions of the obstructed kidneys with a UUO compared with the controls. (A) CCD of a control kidney. (B) CCD of an obstructed kidney with a UUO. (C) CCD of a nonobstructed kidney with a UUO. (D) OMCD of a control kidney. (E) OMCD of an obstructed kidney with a UUO. (F) OMCD of a nonobstructed kidney with a UUO. All panels are representative of the findings from six control and six UUO kidneys. All panels were photographed and reproduced at the same magnification.

실험군에서 피질과 수질 집합관의 A형 사이세포의 높이는 대조군과 차이가 없었다. 실험군에서 피질 집합관 사이세포의 총 Rhcg 발현은 대조군에 비하여 비폐쇄부위는 $106.1 \pm 23.3\%$ 로 차이가 없었으나 폐쇄부위는 $69.5 \pm 18.6\%$ 로 유의하게 감소하여 양군 간에 유의한 차이를 보였으며 자유면 세포막에서의 Rhcg 발현도 대조군에 비하여 비폐쇄부위는 $95.7 \pm 36.4\%$ 로 차이가 없었으나 폐쇄부위는 $64.8 \pm 28.8\%$ 로 유의하게 감소하여 양 군 간에 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$, Table 3). 실험군에서 외수질 집합관의 총 Rhcg 발현은 대조군에 비하여 비폐쇄부위는 $105.8 \pm 19.6\%$ 로 차이가 없었으나 폐쇄부위는 $61.9 \pm 17.3\%$ 로 유의하게 감소하여 양군 간에 유의한 차이를 보였으며 자유면 세포막에서의 Rhcg 발현도 대조군에 비하여 비폐쇄부위는 $99.8 \pm 23.3\%$ 로 차이가 없었으나 폐쇄부위는 $65.7 \pm 27.1\%$ 로 유의하게 감소하여 양 군 간에 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$, Table 3).

고 찰

신세뇨관성 산증은 다양한 병태생리학적 기전으로 발생하며, 그 기전으로는 H^+ -ATPase의 결손이나 기능적 장애가 있는 수소이온 분비장애형(secretory defect), 경사차 결함형(grainient defect), 수소이온 분비에 필요한 경세포막 전위차를 형성하지 못하는 전위차 결함형(voltage defect), 수소이온이 분비되었다가 역학산되는 투과형(permeability defect) 등으로 분류된다[2,12]. 요로폐쇄는 산배설이 감소하고 세뇨관성 산성을 유발하는 것으로 알려져 있으나 기전에 있어서는 불명확하여 연구에 따라 수소이온 분비장애형 또는 전위차 결함형 신세뇨관산증이 유발하는 것으로 보고되고 있다[13,14].

본 연구 결과에 따르면 일측 요로폐쇄 24시간 후 대조군에 비하여 혈중 중탄산염 농도가 감소하고 24시간 요 검사에서 요중 암모니아 배설이 감소되고 요 pH가 5.5 이상으로 측정되어 신세뇨관산증이 유발됨을 확인하였으며 이와 함께

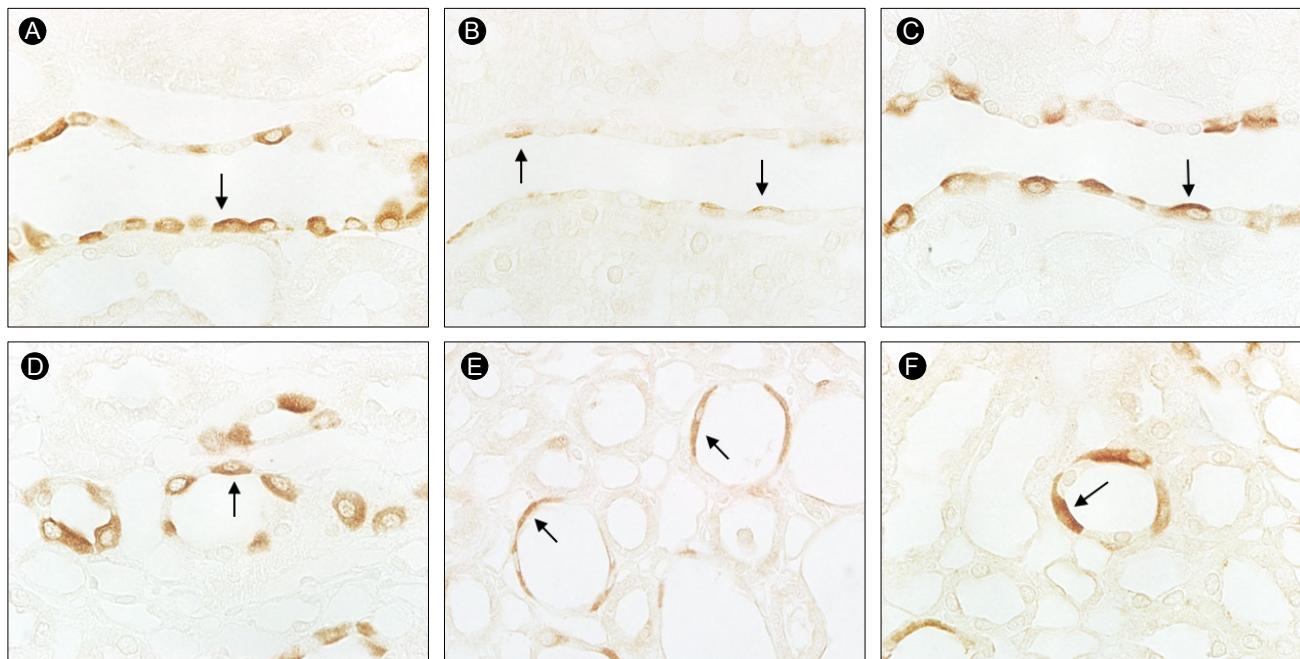


Figure 3. H^+ -ATPase immunoreactivity in the cortical collecting duct (CCD) and outer medullary collecting duct (OMCD) of control, obstructed, and nonobstructed kidneys with a unilateral ureteral obstruction (UUO). Predominant immunoreactivity for H^+ -ATPase was detected in the apical plasma membrane of intercalated cells from an OMCD and CCD (black arrow). H^+ -ATPase expression was reduced in those regions of the obstructed kidneys with a UUO compared with the controls.

(A) CCD of a control kidney. (B) CCD of an obstructed kidney with a UUO. (C) CCD of a nonobstructed kidney with a UUO. (D) OMCD of a control kidney. (E) OMCD of an obstructed kidney with a UUO. (F) OMCD of a nonobstructed kidney with a UUO. All panels are representative of the findings from six control and six UUO kidneys. All panels were photographed and reproduced at the same magnification.

Table 3. Quantitative immunohistochemistry analysis for Rhcg expression in response to unilateral ureteral obstruction

	CCD		OMCD	
	OBS	NonOBS	OBS	NonOBS
Cell height	95.1 \pm 17.6	94.8 \pm 18.4	92.7 \pm 17.4	93.1 \pm 15.7
Total Rhcg expression	69.5 \pm 18.6 ^a	106.1 \pm 23.3 ^b	61.9 \pm 17.3 ^a	105.8 \pm 19.6 ^b
Rhcg expression in the apical region	64.8 \pm 28.8 ^a	95.7 \pm 36.4 ^b	65.7 \pm 27.1 ^a	99.8 \pm 23.3 ^b
Relative proportion of apical Rhcg	91.8 \pm 33.5	89.5 \pm 29.0	105.2 \pm 35.4	95.7 \pm 18.7

Values are mean \pm SD. n=Number of rats. All results are normalized to control kidney = 100.

Rhcg, Rh C glycoprotein; CCD, cortical collecting duct; OMCD, outer medullary collecting duct; OBS, obstructed kidney; NonOBS, nonobstructed kidney.

^a $p < 0.05$, vs. Controls, ^b $p < 0.05$, OBS vs. NonOBS.

요로폐쇄부위의 콩팥에서 암모니아 운반체인 Rhcg의 면역 반응성이 감소함을 확인할 수 있었다.

신장에서 암모니아의 배설은 산-염기 평형을 조절하는 주요기전으로 작용한다[15,16]. 최근 암모니아 대사가 증가하는 대표적인 질환인 만성 대사성 산증과 신절제 모델에서 요증 암모니아 배설의 증가와 원위신원에서 암모니아 운반

체인 Rhcg의 발현증가가 동반됨이 확인되었으며[9,10], 만성 사이클로스포린 신증 모델과 아밀로라이드 유발 세뇨관성증에서 요 암모니아 배설의 감소와 함께 암모니아 운반체인 Rhcg의 면역반응성이 감소한다고 보고되어[11,17] 신장의 암모니아 배설에 있어서 암모니아 운반체 Rhcg의 중요성이 부각되고 있다.

본 연구 결과에서 일측 요로폐쇄 모델의 Rhcg의 면역반응성은 폐쇄부위측에서는 발현 감소가 보였으나 비폐쇄부위측은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Valle 등[18]은 일측요로폐쇄 모델에서 선택적으로 요를 채취한 경우 폐쇄부위측에서만 UpH 증가와 중탄산염 분획배설률 증가를 보이고 비폐쇄부위측에는 변화가 없다고 보고하였고 Wang 등[19]도 24시간 일측성 요로폐쇄모델에서 폐쇄부위측의 피질과 수질에서 NHE3 ($\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -exchanger 3), NBC1 ($\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ cotransporter), Pendrin 등의 산-염기 운반체의 발현이 감소하고 비폐쇄부위측에서는 변화가 없다고 보고하여 요로폐쇄부위측에만 Rhcg 발현이 감소한 본 연구 결과와 일치하는 결과로 생각된다.

본 연구에서는 일측성 요로폐쇄 24시간 후에 실험을 종료하였으며 대사케이지를 이용하여 24시간 요를 채취하였다. 이를 통해 일측성 요로폐쇄에 따른 비폐쇄부위측 콩팥의 적응 기전을 확인할 수 있으며 대조군에 비하여 요 암모니아 배설량의 감소가 보인 점에서 24시간 일측성 요로폐쇄에서는 비폐쇄부위측 콩팥의 암모니아 배설 증가가 이루어지지 않은 것을 추정할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 폐쇄부위와 비폐쇄부위측 콩팥에서 선택적으로 요를 채취하여 암모니아 및 중탄산염 배설 정도를 확인하지 못한 제한점을 가지고 있다.

이전의 신절제 모델에서 암모니아 운반체에 관한 연구에서는 사구체 여과율이 대조군에 비하여 약 60%가 감소하였으며 사구체 여과율로 보정한 요 암모니아 배설량은 2배 정도 증가하였다. 이와 함께 Rhcg 면역조직화학염색검사의 정량적 분석에서 세포의 크기가 증가하고 Rhcg의 자유면 세포막의 발현이 증가함으로써 신절제 모델의 적응기전으로서 기여할 것으로 보고되고 있다[10]. 본 연구에서 일측성 요로폐쇄 모델의 사구체 여과율은 대조군에 비하여 약 30%가 감소하였으며, 사구체 여과율로 보정한 요 암모니아 배설량은 유의한 차이가 없었다. 신절제 모델에 비하여 일측성 요로폐쇄 모델에서는 사구체 여과율의 감소 정도가 적고 비폐쇄부위측 콩팥의 암모니아 배설 증가 정도가 적으므로 대조군에 비하여 세포 크기의 변화가 없고 비폐쇄부위측 콩팥의 Rhcg 발현에도 유의한 차이를 보이지 않았을 것으로 생각할 수 있다. 따라서 향후 일측성 요로폐쇄 기간을 24시간 이상으로 진행하였을 때 사구체 여과율 및 암모니아 배설량의 변화 정도와 비폐쇄부위측 콩팥의 Rhcg의 변화 정도를 확인하는

연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 일측 요로폐쇄 모델의 폐쇄부위측 콩팥 Rhcg의 면역반응성은 면역조직화학염색법에서는 유의한 감소를 보였으나 immunoblot 결과에서는 감소하는 경향은 보였으나 유의한 차이는 없었다. 이와 같은 결과는 요 암모니아 배설량이 대조군에 비하여 25배 정도 증가한 만성 대사성산증 모델에서는 Rhcg의 면역반응성이 immunoblot에서도 유의한 상승을 보였으나[9] 대조군에 비하여 2배 정도 증가한 신절제 모델이나 1/2 정도 감소한 아밀로라이드 투여 모델에서는 Rhcg의 면역반응성이 immunoblot에서는 큰 차이를 보이지 않고 면역조직화학염색 검사에서만 유의한 변화를 보였던 점을 고려할 때, 본 연구 모델에서 암모니아 배설의 변화 정도가 심하지 않은 점을 반영하는 결과로 생각된다[10,17,20].

본 연구에서 요로폐쇄 후 암모니아 운반체인 Rhbg의 면역반응성은 대조군과 유의한 차이가 없었다. 이 결과는 이전에 보고된 연구와 일치하는 결과를 보여주고 있다[9,10].

신장의 원위신원에는 산을 비하는 A형 사이세포가 산-염기 평형에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12,21-23]. 원위신원의 60%를 차지하는 주세포는 기저외측세포막에 존재하는 Na^+/K^+ -ATPase의 활성에 의해 자유면세포막에 존재하는 상피 소디움 통로를 통해 소디움의 세포 유입이 이루어지고, 세뇨관강 내의 음전하가 생성되어 사이세포의 수소이온을 분비를 증가시켜 산-염기 평형 조절에 관여한다. 원위신원의 A형 사이세포의 자유면세포막에 존재하는 vacuolar H^+ -ATPase는 원위신원의 수소이온 분비에 중요한 운반체로 알려져 있다[21,23]. 원위부 신세뇨관산증 환자에서도 A형 사이세포의 자유면세포막에 있는 H^+ -ATPase의 발현이 결손됨을 확인하여 신세뇨관성 산증의 병태 생리를 규명하는 데 요산성화에 관여하는 산-염기 운반체의 결손이 세포 단위의 분자수준에서 증명되고 있다[24,25].

요로폐쇄는 세뇨관성 산성을 유발하는 것으로 알려져 있으나 기전에 있어서는 다양한 연구 결과가 보고되고 있다. 생체 외 세뇨관 관류연구(*in vitro* tubule perfusion study)에서 요로폐쇄는 막전위차(transmembrane potential difference)가 감소함으로써 내강 음전위를 충분히 형성하지 못하게 하여 전위차 결합형 원위부 신세뇨관산증을 유발하는 것으로 알려져 있으며[26], 콩팥의 생체 내 미세천자연구(*in vivo* micropuncture study)에서는 수소이온 분비가 감소하여 분비장애형 신세뇨관산증이 유발되는 것으로 제시되고 있다[13].

요로폐쇄 콩팥에서 H^+ -ATPase 및 H^+-K^+ -ATPase의 활성도 감소도 산배설 장애에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다 [15,27-29].

본 연구에서는 일측성 요로폐쇄군의 H^+ -ATPase에 대한 면역조직화학염색 검사에서 비폐쇄부위측은 대조군과 큰 차이가 없었으나 폐쇄부위측의 콩팥 H^+ -ATPase의 면역반응성이 유의하게 감소함을 확인하였다. 일측성 요로폐쇄모델에서 H^+ -ATPase 발현에 대해서 Wang 등[19]은 H^+ -ATPase는 폐쇄부위측에 변화가 없다고 보고하였으나 Valles 등[18]은 일측성 요로폐쇄 모델에서 폐쇄부위측 콩팥의 H^+ -ATPase 발현이 감소됨을 보고하여 연구마다 다른 결과를 보고하고 있다.

일측성 요로폐쇄 모델에서 비폐쇄부위측 콩팥의 H^+ -ATPase 발현은 변화가 없다는 보고도 있으나[19], 폐쇄부위측의 H^+ -ATPase 활성도 감소와 함께 비폐쇄부위측의 활성도가 증가하고[27], 요로 폐쇄의 기간을 1일, 3일, 5일로 연장한 경우 면역조직화학염색에서 H^+ -ATPase의 발현이 비폐쇄부위측 콩팥에서는 점차 증가함이 보고되었다[29]. 본 연구에서는 폐쇄부위측 콩팥의 H^+ -ATPase 감소에 비하여 비폐쇄부위측은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며 이는 폐쇄 정도에 따른 비폐쇄부위측 콩팥의 산배설 증가 정도가 영향을 줄 수 있을 것으로 생각하며 향후 요로폐쇄의 기간에 따른 H^+ -ATPase 및 Rhcg와 변화 정도를 확인하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 또한 향후 요로폐쇄의 해제 후 경과에 따른 암모니아 배설과 암모니아 운반체의 변화 여부를 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 종합하면 일측성 요로폐쇄에서 요증 암모니아 배설 감소와 암모니아 운반체 Rhcg 발현 감소를 확인하였으며 요로폐쇄의 요산성화농 장애에 있어서 암모니아 운반체 Rhcg가 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.

요 약

목적: 일측 요로폐쇄는 요증 산배설이 감소하는 질환으로 대부분 요 암모니아 배설의 감소에 의한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 일측 요로 폐쇄 흰쥐에서 산배설의 변화와 암모니아 운반체인 Rh C Glycoprotein (Rhcg)의 발현 변화를 확인하여 신세뇨관산증의 병인에 암모니아 운반체의 역할을 규명하고자 하였다.

방법: Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였으며, 실험

군은 24시간 일측 요로폐쇄를 유발시켰다. 대조군과 실험군은 대사케이지에 mineral oil을 처리하여 24시간 동안 요를 수집하였다. Rhcg의 면역조직화학염색을 시행하였고 세포 크기, 총 Rhcg 발현, 자유세포면의 Rhcg 발현에 대하여 면역조직화학염색법을 정량화 분석하였다.

결과: 일측 요로폐쇄군에서 혈중 tCO_2 농도는 대조군 27.5 ± 2.8 mEq/L에 비하여 실험군은 25.2 ± 1.0 mEq/L로 감소하였다($p < 0.05$). 24시간 요 암모니아 배설은 대조군 0.38 ± 0.08 mmol에 비하여 실험군에서 0.19 ± 0.03 mmol로 요 암모니아 배설이 감소하였으며($p < 0.05$), Urine pH는 양 군 간에 차이가 없어 일측성 요로폐쇄에 의해 신세뇨관산증이 유발되었음을 확인하였다. 반정량적 immunoblot 검사에서 Rhcg의 단백 발현은 양군 간에 유의한 차이가 없었다. 면역조직화학염색과 정량화 분석 결과 일측 요로폐쇄군에서 Rhcg의 면역반응성은 비폐쇄부위 콩팥에서는 차이가 없었으나 폐쇄부위 콩팥에서는 감소하였다.

결론: 일측 요로폐쇄 흰쥐에서 암모니아 배설 감소와 폐쇄부위 콩팥에서 Rhcg의 면역반응성의 감소가 동반되었다. 따라서 일측 요로폐쇄의 산성화 장애 병인에 암모니아 운반체 Rhcg가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

중심 단어: 요로폐쇄; 신세뇨관산증; 암모니아; 집합관

REFERENCES

1. Gregory MJ, Schwartz GJ. Diagnosis and treatment of renal tubular disorders. *Semin Nephrol* 1998;18:317-329.
2. Bastani B, Gluck SL. New insights into the pathogenesis of distal renal tubular acidosis. *Miner Electrolyte Metab* 1996;22:396-409.
3. DuBose TD Jr, Good DW, Hamm LL, Wall SM. Ammonium transport in the kidney: new physiological concepts and their clinical implications. *J Am Soc Nephrol* 1991;1:1193-1203.
4. Knepper MA. $NH4^+$ transport in the kidney. *Kidney Int Suppl* 1991;33:S95-102.
5. Weiner ID, Verlander JW. Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein. *Acta Physiol Scand* 2003;179:331-338.
6. Eladari D, Cheval L, Quentin F, et al. Expression of RhCG, a new putative $NH(3)/NH(4)^+$ transporter, along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1999-2008.
7. Weiner ID, Miller RT, Verlander JW. Localization of the ammonium transporters, Rh B glycoprotein and Rh C

- glycoprotein, in the mouse liver. *Gastroenterology* 2003;124: 1432-1440.
8. Han KH, Croker BP, Clapp WL, et al. Expression of the ammonia transporter, rh C glycoprotein, in normal and neoplastic human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2670-2679.
 9. Seshadri RM, Klein JD, Kozlowski S, et al. Renal expression of the ammonia transporters, Rhbg and Rhcg, in response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F397-408.
 10. Kim HY, Baylis C, Verlander JW, et al. Effect of reduced renal mass on renal ammonia transporter family, Rh C glycoprotein and Rh B glycoprotein, expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F1238-1247.
 11. Lim SW, Ahn KO, Kim WY, et al. Expression of ammonia transporters, Rhbg and Rhcg, in chronic cyclosporine nephropathy in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2008;110:e49-58.
 12. Sabatini S. Experimental studies in distal urinary acidification: bringing the bedside to the bench. *Semin Nephrol* 1999;19:188-194.
 13. Arruda JA, Kurtzman NA. Mechanisms and classification of deranged distal urinary acidification. *Am J Physiol* 1980; 239:F515-523.
 14. Kurtzman NA. Acquired distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 1983;24:807-819.
 15. Kurtzman NA. Disorders of distal acidification. *Kidney Int* 1990;38:720-727.
 16. Knepper MA, Packer R, Good DW. Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev* 1989;69:179-249.
 17. Kim SJ, Kim HY, Choi JH, et al. Renal expression of ammonia transporters in rats with amiloride-induced renal tubular acidosis. *Korean J Med* 2011;80:687-696.
 18. Vallés P, Merlo V, Berón W, Manucha W. Recovery of distal nephron enzyme activity after release of unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 1999;161:641-648.
 19. Wang G, Ring T, Li C, et al. Unilateral ureteral obstruction alters expression of acid-base transporters in rat kidney. *J Urol* 2009;182:2964-2973.
 20. Valles PG, Manucha WA. H⁺-ATPase activity on unilateral ureteral obstruction: interaction of endogenous nitric oxide and angiotensin II. *Kidney Int* 2000;58:1641-1651.
 21. Brown D, Gluck S, Hartwig J. Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H⁺-ATPase. *J Cell Biol* 1987; 105:1637-1648.
 22. Hamm LL, Simon EE. Roles and mechanisms of urinary buffer excretion. *Am J Physiol* 1987;253(4 Pt 2):F595-605.
 23. Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova TY, Lee BS. Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Physiol* 1996;58: 427-445.
 24. Dafnis E, Spohn M, Lonis B, Kurtzman NA, Sabatini S. Vanadate causes hypokalemic distal renal tubular acidosis. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 2):F449-453.
 25. Kim HY, Han JS, Jeon ES, et al. Defect of acid-base transporters in distal renal tubular acidosis. *Korean J Nephrol* 2000;19:899-909.
 26. Hanley MJ, Davidson K. Isolated nephron segments from rabbit models of obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 1982;69:165-174.
 27. Eiam-Ong S, Dafnis E, Spohn M, Kurtzman NA, Sabatini S. H-K-ATPase in distal renal tubular acidosis: urinary tract obstruction, lithium, and amiloride. *Am J Physiol* 1993;265 (6 Pt 2):F875-880.
 28. Mujais SK. Transport enzymes and renal tubular acidosis. *Semin Nephrol* 1998;18:74-82.
 29. Purcell H, Bastani B, Harris KP, Hemken P, Klahr S, Gluck S. Cellular distribution of H(+)ATPase following acute unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Physiol* 1991; 261(3 Pt 2):F365-376.