

신세뇨관 나트륨 운반체의 조절 기전

한림대학교 의과대학 내과학교실

김 근 호

서 론

정상적인 체액량과 혈압은 체내 염분 평형에 의해 유지되고, 이는 신세뇨관의 염분 재흡수에 의해 조절된다. 실제 요중에 배설되는 염분의 양은 사구체에서 여과된 염분의 0.5-1%에 불과하므로, 만약 어느 특정한 부위의 신세뇨관에서 염분 재흡수 장애가 조금만 있어도 요중 염분 배설량이 수배 증가하여 체액결핍과 저혈압이 초래될 수 있다. 정상적으로 사구체에서 여과된 염분은 세뇨관을 거치는 동안 근위세뇨관에서 70%, 헨리고리관 비후상행각에서 20%, 원위곡세뇨관에서 약 7%, 집합관에서 3% 정도 재흡수된다. 이제까지의 연구결과를 통하여 여러 가지 생리적 자극에 의해 이들 세뇨관에서 염분 이동이 조절된다는 사실이 알려졌고, 최근에는 각 세뇨관 부위에서 나트륨 이동을 매개하는 나트륨 운반체들의 존재가 밝혀지고 있다. 즉, 근위세뇨관과 헨리고리관 비후상행각의 Na-H exchanger type 3(NHE3), 헨리고리관 비후상행각의 bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter(BSC-1), 원위곡세뇨관의 thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter(TSC), 집합관의 epithelial Na channel(ENaC)이 대표적인 신장의 나트륨 운반체들이다.

신세뇨관에 작용하여 염분 재흡수를 조절하는 호르몬으로는 이제까지 알도스테론이 잘 알려져 있고, 염분 이동과 밀접한 관계에 있는 수분 이동에 작용하는 바소프레신의 역할 또한 제시된 바 있다. 한편, NHE3 및 BSC-1과 같은 나트륨 운반체는 나트륨 이동 뿐 아니라 각각 수소이온 및 암모늄이온의 이동에도 관여하므로 염분 평형과 산-염기 평형의 상호관계에 대하여 이해하는 것도 흥미로운 것이다. 이와 관련하여, 저자는 1997년 4월부터 1999년 3월까지 미국 National Institutes of Health의 Laboratory

of Kidney and Electrolyte Metabolism에서 Dr. Mark Knepper의 지도 아래 신세뇨관 나트륨 운반체의 조절 기전에 관한 몇 가지 연구과제를 수행하였다. 쥐 실험모델을 이용하여 1) 알도스테론 자극, 2) 바소프레린 자극 및 3) 산-염기 섭취 증가에 따른 신세뇨관 각 부위의 나트륨 운반체 발현의 변화를 단백질 수준에서 조사함으로써 신세뇨관 염분 재흡수의 조절 기전을 이해하는데 보탬이 되고자 하였다

본 론

1. 알도스테론에 의한 원위부 신세뇨관 나트륨 운반체 발현의 조절

알도스테론은 신장에 작용하여 나트륨 재흡수를 증가시킴으로써 체액과 혈압을 유지하는데 결정적으로 기여하는 호르몬이다. 알도스테론이 포유류 신장에 작용하는 가장 주요한 부위는 피질 집합관으로 이곳 내강쪽 세포막에 분포하는 epithelial Na channel(ENaC)을 통해 나트륨 재흡수를 조절하는 것으로 이제까지 알려져 왔다. 그러나, 최근 연구결과 원위곡세뇨관 또한 알도스테론에 영향받는다라는 보고가 있었고, 원위곡세뇨관에서의 염분 이동은 thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter(TSC)에 의한 것이라는 사실이 밝혀졌다. 따라서 저자 등¹⁾은 알도스테론이 원위곡세뇨관에 작용하여 TSC를 조절함으로써 체내 나트륨 대사에 기여할 것이라고 생각하게 되었다. 이러한 가설을 증명하고자, TSC에 대한 다클론항체를 개발하였고 이를 이용하여 두 가지 실험동물 모델에서 반정량적 immunoblot 분석과 면역형광 현미경검사법을 시행하였다.

Sprague-Dawley rat의 신피질 단백을 TSC 항체로 immunoblot하였을 때 165 kDa 근처에서 강한 band가 관찰되었으나, 신수질에서는 band가 관찰되지 않았다. 또한, 신장의 면역형광 면역세포화학법 결

과 TSC 염색은 원위극세뇨관에서만 관찰되었다. 순환혈액내 알도스테론 분비를 자극시키고자 10일간 저염분 식이를 공급한 실험군에서 반정량적 immunoblot 분석을 시행한 결과 TSC 단백질의 발현이 대조군에 비하여 $207 \pm 21\%$ 로 크게 증가하였고($p < 0.005$), 면역형광 면역세포화학법상에서도 원위극세뇨관에서 TSC의 발현이 뚜렷하게 증가한 것을 확인하였다. mineralocorticoid 호르몬의 직접 자극 효과를 알아보기 위하여 알도스테론을 10일간 지속적 피하 주입하였을 때 TSC 단백질 발현이 대조군에 비해 $380 \pm 58\%$ 로 증가하였고($p < 0.05$) fludrocortisone을 7일간 경구 투여한 경우에도 대조군에 비해 $656 \pm 114\%$ 로 크게 증가하였다($p < 0.05$). 결론적으로, 혈중 알도스테론 농도를 증가시키는 생리학적 모델인 저염분 식이와 약리학적 모델인 알도스테론의 지속적 피하 주입의 두 가지 실험 결과에서 TSC 단백질 발현이 증가한다는 동일한 결과를 얻음으로써 TSC가 알도스테론에 의해 유도되는 생리적으로 중요한 단백질(aldoosterone-induced protein)임을 증명하게 되었다.

한편, 이제까지 aldosterone-induced protein으로 짐작되어 오던 집합관의 ENaC에 대한 실험을 같은 실험동물 모델에서 시행하였다²⁾. α -, β - 및 γ -subunit에 대한 다클론항체를 각각 개발하여 immunoblot과 면역세포화학법을 통해 그 특이성을 검증하였다. 저염분 식이 공급에 의해 α ENaC 단백질은 대조군에 비해 $285 \pm 28\%$ 로 증가하였으나($p < 0.001$), β 와 γ ENaC 단백질량은 변화를 보이지 않았다. γ ENaC 단백질의 경우 대조군에서 뚜렷하게 관찰되던 85-kDa band가 감소하면서 70 kDa 위치에서 새로운 band가 나타났다. 알도스테론 주입에 의해서도 α ENaC 단백질이 대조군에 비해 $472 \pm 84\%$ 로 크게 증가하고($p < 0.01$), β 와 γ ENaC 단백질량은 변하지 않으면서 γ ENaC 단백질의 위치가 이동하는 동일한 결과를 보였다. 또한, 대조군에서 면역세포화학법상 세포내에 미만성 분포를 보이던 ENaC 단백질이 저염분 식이에 의해 내강쪽 세포막으로 재분포하는 소견을 관찰하였다. 이상에서 ENaC 단백질은 알도스테론 자극에 의해 아형마다 서로 다른 반응을 보이면서 세포내 재분포하는 것이 운반체의 활성화의 중요한 기전으로 생각된다.

2. 바소프레신에 의한 헨리고리관 비후상행각 Na-K-2Cl cotransporter 발현의 조절

신장은 사구체에서 수분을 여과시키고 세뇨관에서 수분을 재흡수하는 과정에 의해 체내 수분 대사를 유지한다. 이러한 세뇨관 부위 중 헨리고리관과 집합관은 바소프레신의 자극에 따른 조절기능을 갖고 있어서 그 생리적 역할이 크다. 집합관에서는 내강쪽 세포막에 위치하는 수분통로 AQP-2가 수분 재흡수를 매개하는데, 바소프레신의 단기 자극에 의해 AQP-2가 세포질로부터 내강쪽 세포막으로 이동하며 장기 자극에 의해 AQP-2 단백질 생성이 증가함으로써 요 농축능이 발휘되는 것으로 밝혀졌다. 한편, 헨리고리관은 반류증폭(countercurrent multiplication)에 의해 신장 수질의 간질부를 고장화시킴으로써 집합관에서 이루어지는 수분 재흡수를 도모하는 역할을 한다. 반류증폭의 효과는 헨리고리관 비후상행각의 내강쪽 세포막에 위치한 염분 운반체 Na-K-2Cl cotransporter의 능동적 염분 재흡수에서 비롯되는 것으로 알려졌다(single effect). 체외세뇨관미세관류법을 이용한 연구에서 바소프레신의 단기 자극에 의해 Na-K-2Cl cotransporter 활성이 증가한다는 보고가 있었으나, 그 기전에 대해서는 알려지지 않았고 또한, 바소프레신의 장기 자극에 의해 비후상행각에서 염분 재흡수가 증가하여 요 농축을 증진시키는 기전에 대해서는 연구된 바 없었다. 따라서 저자 등³⁾은 바소프레신의 장기 자극에 의해 헨리고리관 비후상행각에서 염분 재흡수가 증가하는 기전을 규명하고자, 장기간 혈중 바소프레신이 증가하는 상태에서 헨리고리관 비후상행각의 여러 나트륨 운반체들의 발현에 변화가 있는지 관찰하였다. 이를 위하여 비후상행각 Na-K-2Cl cotransporter에 대한 다클론항체를 개발하였고, Sprague-Dawley rat을 이용한 수분제한 모델과 선천성 바소프레신 분비 결핍 상태인 Brattleboro rat에서 제 2 바소프레신수용체 자극제인 dDAVP를 투여한 실험동물 모델에서 반정량적 immunoblot 분석과 면역형광 현미경검사법을 시행하였다.

생리적 자극으로 혈중 바소프레신 농도를 증가시키고자 Sprague-Dawley rat에서 수분 섭취를 15ml/일로 제한한 실험군을 대조군(수분섭취 37ml/일)과 비교하였다. 7일 경과후 수분제한 실험군의 요 삼투질 농도는 2913 ± 175 mosm/kg H₂O로서 대조군의

549±22mosm/kg H₂O에 비해 높았다(p<0.0001). 신장 외수질로부터 시행한 immunoblot 결과, Na-K-2Cl cotransporter 단백 발현이 실험군에서 대조군에 비하여 193±32%로 증가하였고(p<0.05), 제 2 수분통로(AQP2)와 제 3수분통로(AQP3)의 단백 발현 역시 각각 대조군에 비하여 575±146%, 455±125%로 증가하였다(p<0.05). 그러나, 비후상행각 내 강쪽 세포막에 분포하는 다른 운반체인 Tamm-Horsfall protein과 NHE3는 신장 외수질에서 그 발현에 변화가 없었다. 한편, 바소프레신의 직접 자극효과를 판단하고자 Brattleboro rat에서 osmotic minipump를 이용하여 제 2 바소프레신수용체 자극제인 dDAVP를 7일간 피하주입하였다. 신장 외수질의 immunoblot 결과 Na-K-2Cl cotransporter 단백 발현이 dDAVP 투여군에서 대조군에 비하여 183±16%로 증가하였고(p<0.005), 면역형광 현미경검사법에서도 dDAVP 투여 후 비후상행각에서 Na-K-2Cl cotransporter 단백질 발현이 뚜렷하게 증강되는 것을 관찰하였다. 결론적으로 바소프레신은 비후상행각의 Na-K-2Cl cotransporter 단백 발현을 상승조절시키고, 이는 헨리고리관에서 반류기전(counter-current multiplication)을 강화시켜 장기적인 요 농축능을 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각한다⁴⁾.

또한, 같은 실험 모델에서 헨리고리관 박하행각에 분포하는 요소 운반체인 UT-A2의 발현에 대하여 조사하였다⁵⁾. 최근 바소프레신에 의하여 UT-A2 mRNA 발현이 증가한다는 보고가 있었으나, 단백 수준에서 이에 대한 규명은 없었다. Brattleboro rat에서 7일간 dDAVP를 투여한 결과 55 kDa에 위치한 외수질의 UT-A2 단백질이 대조군에 비하여 518±57%로 증가하였고(p<0.001), 내수질에 분포한 UT-A2 단백질도 대조군에 비하여 225±35%로 증가하였다(p<0.005). 이러한 소견은 면역형광 현미경검사법에서도 확인하였다. 요컨대, 헨리고리관 박하행각에 위치하는 UT-A2가 바소프레신에 의해 상승조절되어 요 농축능에 기여할 것으로 생각한다.

3. 산-염기 섭취 증가에 따른 신세뇨관 나트륨 운반체 발현의 변화

헨리고리관 비후상행각에 존재하는 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter는 암모늄 이온이 칼륨 이온과 이 운반체에 경쟁적으로 결합하므로 산-염기

평형에도 관여할 것이다. 헨리고리관에서 재흡수된 암모늄은 수질부 간질에 축적되어 농도 경사에 따라 집합관으로부터 요중으로 쉽게 분비되어 요 산성화를 이룬다. 수질부 간질에 축적되는 암모늄 양은 대사성 산증에서 증가하고 대사성 알칼리증에서는 감소하여 산-염기 평형 조절에 기여한다고 알려졌다. 저자 등⁶⁾은 산-염기 섭취 증가에 따라 수질부 간질에 축적되는 암모늄 양의 변화를 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter 등 헨리고리관 비후상행각에 분포하는 운반체들의 발현 조절에 의한 것으로 가정하였다. 이 가설을 검증하고자 Sprague-Dawley rat에서 NH₄Cl, NaHCO₃ 및 NaCl을 각각 5-7일간 7.2mmol/220g BW/d 경구 투여한 후 신장을 절제하여 외수질로부터 반정량적 immunoblot 분석을 시행하였다.

NH₄Cl를 7일간 투여한 경우에 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter 및 Na-K-ATPase 단백질 발현은 대조군과 차이가 없었으나 NHE3 단백질 발현이 유의하게 증가하였다(167±10%, p<0.005). 반면에, NaHCO₃를 7일간 투여한 경우 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter(164±6%, p<0.001) 및 Na-K-ATPase(209±30%, p<0.01) 단백질 발현이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 5일간 고염분 식이를 공급한 경우 또한 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter(150±4%, p<0.001) 및 Na-K-ATPase(189±42%, p<0.05) 단백질 발현이 유의하게 증가하였다. 그러나, NHE3 단백질은 NaHCO₃ 부하 또는 고염분 식이에 의해 그 발현의 변화가 없었다. 마지막으로, 7일간 동량(7.2mmol/220gBW/d)의 NaHCO₃과 NaCl을 각각 투여하여 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter, NHE3, Na-K-ATPase 단백질 발현을 비교하였을 때 모두 차이가 없었다. 결론적으로, 만성 대사성 산증에 의해 신수질 비후상행각의 NHE3 단백질 발현이 증가하지만 Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ cotransporter와 Na-K-ATPase는 산-염기 부하에 의해 그 단백질 발현이 조절되지 않고 나트륨의 장기 부하에 의해 그 발현이 증가한다. 나트륨 부하시 나트륨 운반체의 발현이 증가한 것은 간질내 삼투농도를 증가시킴으로써 나트륨이뇨에 따른 수분 소실을 방지하기 위한 조절기전으로 생각한다.

한편, 대사성 산증에 대한 보상 작용으로 NHE3의 활성이 증가하면, 근위세뇨관에서 염분 재흡수가 증가하게 될 것이고 이에 의해 체내 염분 축적이 초래될

것이 우려된다. 그러나 실제로는 NHE3 활성의 증가에도 불구하고 요중 나트륨 배설에는 변화가 없어 체내 염분 축적이 발생하지 않는데, 이는 근위세뇨관에서 발생한 염분 재흡수 증가가 원위부 세뇨관의 보상 반응에 의해 상쇄될 가능성으로 설명할 수 있다. 저자 등⁷⁾은 이러한 가설을 검증하고자, 산부하시킨 쥐 신장에서 반정량적 immunoblot 분석을 통하여 TSC와 ENaC 단백질의 발현을 조사하였다. 7.2mmol의 NH₄Cl를 7일간 투여한 후 신피질에서 TSC 단백질은 47±5%로 유의하게 감소하였고(p<0.005), ENaC-β subunit과 ENaC-γ subunit도 각각 36±4%, 49±5%로 유의하게 감소하였으나(p<0.005), ENaC-α subunit 단백질 발현에는 변화가 없었다. 외수질에서도 유사한 양상의 ENaC 단백질 발현 변화 소견이 관찰되었다. 이상과 같이 산 부하에 의해 TSC 및 ENaC 단백질 발현이 감소한 것은 대사성 산증시 나트륨 평형을 유지하기 위한 조절기전으로 생각된다.

결 론

알도스테론은 집합관뿐 아니라 원위곡세뇨관에도 작용하여 thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter 단백질 발현을 상승조절시킴으로써 염분 평형을 유지한다. 바소프레신은 헨리고리관 비후상행각의 Na-K-2Cl cotransporter 단백을 상승조절시켜 염분 재흡수를 증가함으로써 요 농축에 기여한다. 나트륨을 부하하면 헨리고리관 비후상행각의 Na-K-2Cl cotransporter와 Na-K-ATPase 운반체의 발현이 증가하는데, 이는 간질내 삼투질농도를 증가시킴으로써 나트륨이뇨에 따른 수분 소실을 방지하기 위한 조절기전으로 생각한다. 산 부하에 의해 thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter 및 epithelial Na channel 단백질 발현

이 감소한 것은 대사성 산증에서 나트륨 평형을 유지하기 위한 보상 기전일 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Kim G-H, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14552-14557, 1998
- 2) Masilamani S, Kim G-H, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA: Aldosterone-mediated regulation of ENaC α, β and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104, 1999(in press)
- 3) Kim G-H, Ecelbarger CA, Mitchell C, Packer RK, Wade JB, Knepper MA: Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol* 276(Renal Physiol 45): F96-F103, 1999
- 4) Knepper MA, Kim G-H, Fernandez-Llama P, Ecelbarger CA: Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* 10:628-634, 1999
- 5) Wade JB, Lee AJ, Ecelbarger CA, Mitchell C, Bradford AD, Terris J, Kim G-H, Knepper MA: Regulation of urea transporter(UT-A2) abundance in thin descending limb by vasopressin. *J Am Soc Nephrol* 9:28A, 1998(abstract)
- 6) Kim G-H, Ecelbarger CA, Knepper MA, Packer RK: Regulation of thick ascending limb ion transporter abundance in response to altered acid/base intake. *J Am Soc Nephrol* 10:935-942, 1999
- 7) Kim G-H, Packer RK, Masilamani S, Martin SW, Fernandez-Llama P, Wade JB, Nielsen S, Knepper MA: Long-term acid loading decreases abundance of thiazide-sensitive cotransporter and epithelial Na channel proteins in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 10, 1999(abstract)