

## 신성고혈압 가토 신장기능에 미치는 Acetylcholine의 영향

충남대학교 의과대학 외과학교실\*, 전북대학교 의과대학 생리학교실, 의학연구소

노승무\* · 김선희 · 조경우

### 〈요 약〉

Acetylcholine의 신장 기능에 미치는 영향과 그 기전을 구명하고 acetylcholine의 신장 효과가 신성 고혈압 가토에서 어떠한 변동을 일으키는지 밝히고자 하였다.

일측 신장내 acetylcholine(0.03-0.3ug/kg/min) 투여는 투여 신장에 국한하는 요량, 유리 수분 배설량, 요 중 전해질 및 nitrate 배설량,  $FE_{Na}$  그리고 신혈류량과 사구체여과율의 용량 의존적인 증가를 보였다. Acetylcholine에 의한 신장 효과는 nitric oxide 생성차단제인 L-NAME 전처리에 의하여 차단되었다.

신성 고혈압 가토의 clip을 가하지 않은 신장 내 acetylcholine 투여는 정상 혈압군과 유사한 신혈류역학적 변동을 보였다. Acetylcholine 투여에 의한 요량, 유리수분 배설량, 요 중 전해질 배설량 그리고  $FE_{Na}$  등의 증가 효과는 신성 고혈압 가토에서 유의하게 항진되어 있었으며 이와 같은 acetylcholine의 신장 효과는 L-NAME에 의하여 차단되었다.

이상의 연구 결과는 acetylcholine의 신혈류역학적 효과와 신세뇨관 효과가 nitric oxide의 유리에 의하여 나타나며, 신성 고혈압 초기에 acetylcholine의 신세뇨관 효과가 항진되어 있음을 시사하였다.

### 서 론

신장 기능에 미치는 acetylcholine의 역할은 오래 전부터 학자간의 흥미있는 대상이 되어 왔다. 일부 학자들에 의하여 신장의 콜린성 신경 분포가 암시되고 있으나<sup>1)</sup> 그 존재를 입증하는 직접적인 증거는 아직 미약하며 많은 논의가 계속되고 있다<sup>2)</sup>. 그러나 신장 내 콜린성 수용체의 존재는 확실하며<sup>2)</sup>, acetylcholine의 신장 내 투여에 의한 요량 및 전해질 배설량 증가의 효과가 muscarine 수용체를 경유하여 나타난다는 사실도 일찍이 알려졌다<sup>3)</sup>. Acetylcholine의 신장효과는 일반적으로 신혈관 이완에 의한 신 혈류량의 증가와 이로 인한 요량, 요 중 전해질 배설량의 증가로 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 신장을 구성하는 여러 가지 조직 즉 최

소한 30 종류 이상의 세포가 모여 형성하는 여러 조직에서 acetylcholine 효과가 어떠한 기전에 기인한 것인지는 아직 확실하지 않고 혈관 이완성 신경 전달 물질이나 호르몬 등에 의한 이노 효과가 신 세뇨관의 반응에 의한 것인지<sup>5,6)</sup> 또는 신혈류 역학적 변화에 의한 것인지<sup>3,7)</sup> 분명치 않다.

Furchgott 등<sup>8,9)</sup>에 의하여 밝혀진 혈관 내피계 세포의 새로운 지견은 말초 혈관과 상피 세포의 복합된 기능에서 의하여 영위되는 기능에서도 적용되리라 사료되므로 이 연구에서는 acetylcholine의 신장 기능에 미치는 영향을 관찰하여 그 기능의 변화를 이러한 관점에서 해석하고자 한 것이다.

고혈압은 다양한 내피층 기능 변화와 관련되어 있음이 알려져 있다. 즉 이완인자의 감소, 수축인자 유리 증가, 그리고 이러한 인자들에 대한 혈관 평활근 반응의 변화 등이다<sup>10-12)</sup>. 고혈압때 야기되는 말초 혈관 내피층의 기능 이상은 말초 저항을 증가시키거나 뇌, 관상, 신순환계 등의 합병증 발생과 관련이 있음

책임저자: 조경우 전북 전주시 덕진구 금암동 산 2-20  
전북대학교 의과대학 생리학교실  
Tel: 063)274-9788, Fax: 063)274-9892  
E-mail: kwcho@moak.chonbuk.ac.kr

이 제시되었다. 고혈압시 실제로 acetylcholine과 다른 내피 의존성 혈관 이완 물질(endothelium-derived relaxing factor, EDRF) agonist에 의한 혈관 이완 반응이 대부분의 혈관에서 감소되어 있기 때문이다<sup>11)</sup>. 따라서 이 연구에서는 EDRF를 유리하여 혈관 이완을 일으킬 수 있는 acetylcholine의 신혈류 역학과 배설 기능에 미치는 효과 그리고 이들 효과의 EDRF/nitric oxide 합성 차단제에 의한 영향을 구명함으로써 acetylcholine-nitric oxide의 신장 효과를 밝히고자 하였다. 뿐만 아니라 이러한 실험 결과를 바탕으로 신성 고혈압의 초기 신장 기능 변동의 과정에 있어서 acetylcholine-nitric oxide의 역할도 구명하였다.

## 재료 및 방법

실험동물은 체중 1.8kg 내외의 New Zealand white 계 가토를 암수 구별없이 사용하였다. 실험은 신성 고혈압군, sham 수술군 그리고 일측 신장절제군으로 나누어 하였으며 수술 일주일 후에 실험을 하였다.

### 1. 실험군

#### 1) 신성 고혈압군

신성 고혈압 모형은 two-kidney, one clip Goldblatt 고혈압 가토(2K1CGHR)로 실험 일주일 전에 만들었다<sup>13)</sup>. 가토는 수술 하루 전에 절식시키고 thiopental sodium 20mg/kg을 정맥에 투여하여 마취시

켰다. 고정대에 배를 아래로 하여 고정하고 우측에 flank incision을 가하여 신장을 노출시키고 우측 신동맥을 분리하여 내경이 0.38-0.40mm인 silver clip을 장치하였다.

#### 2) Sham 수술군

Sham 수술 가토는 silver clip을 장치하는 과정만 제외하고 신성 고혈압 가토군에서와 동일한 방법으로 마취하여 수술하였다.

#### 3) 일측 신장 절제군

일측 신장 절제 가토는 silver clip을 장치하는 대신에 우측 신장을 적출하였으며 마취와 수술은 신성 고혈압군에서와 동일한 방법으로 하였다.

## 2. 방법

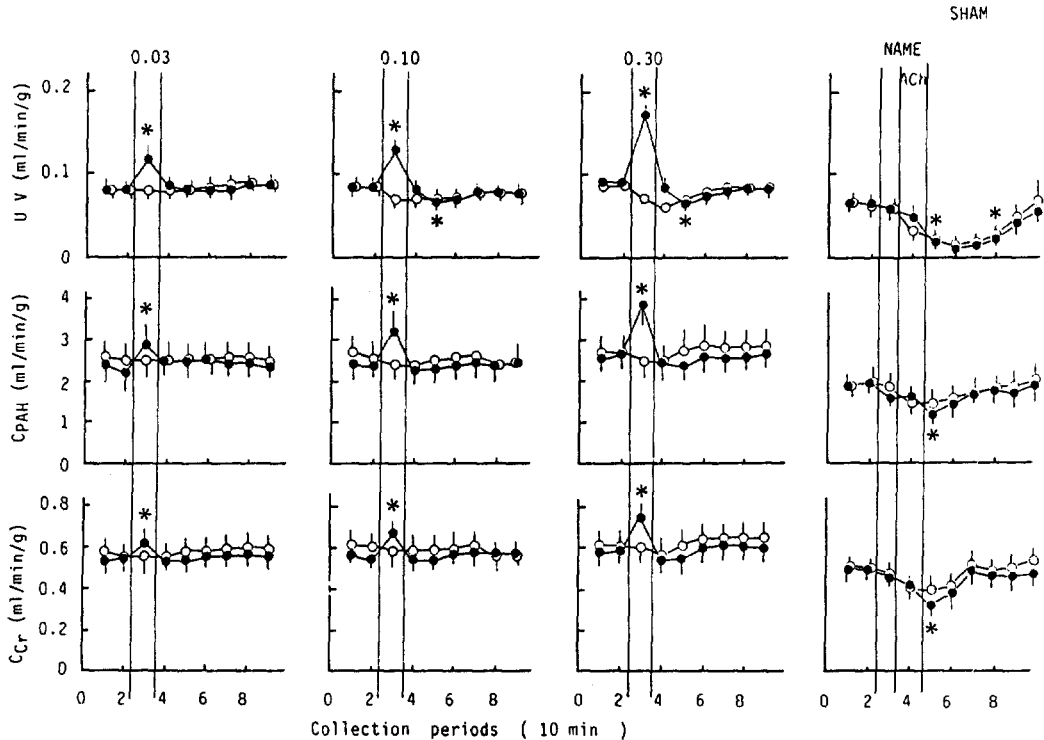
### 1) 신장 실험을 위한 일반적인 실험 방법

수술 일주일 후에 thiopental sodium으로 마취하고 고정대에 배를 위로하여 고정하였다. 이각 정맥에 24 G Neoflon needle tubing을 통하여 저장성 용액을 30mL/kg/hr의 속도로 주입하였으며, 사용한 용액의 조성은 glucose 3%, NaCl 0.3% 그리고 creatinine 0.3%였다. 중심 이동맥에 polyethylene(PE)관을 삽입하여 필요에 따라 채혈하고, 전신동맥압은 중심 이동맥에 삽입된 PE관에 압력변환장치를 연결하여 Physiograph(MK IV, Narco Bio-systems, Houston, Texas, USA)에 기록하였다. 또한 좌측 신동맥 내에 직접 약물 투여를 위해 대퇴 동맥의 일정한 부위에서

Table 1. Blood Pressure and Basal Level of Renal Parameters in Two-kidney One Clip Goldblatt Hypertensive, Sham-operated and Unilateral Nephrectomized Rabbits

	Sham	2K1CGH	NEPHX
BP(mmHg)	106.3±2.8	132.9±1.4*	111.4±3.2
UV(mL/min/g)	0.084±0.005	0.130±0.009*	0.138±0.012*
C <sub>PAH</sub> (mL/min/g)	2.48±0.19	2.27±0.11	2.59±0.16
C <sub>C</sub> (mL/min/g)	0.56±0.04	0.67±0.05	0.67±0.03
U <sub>Na</sub> V(μEq/min/g)	2.49±0.35	3.44±0.53*	4.74±0.68*
U <sub>K</sub> V(μEq/min/g)	0.65±0.05	0.82±0.07*	0.98±0.09*
C <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (μL/min/g)	43.19±3.58	58.59±3.25*	65.85±5.06*
FE <sub>Na</sub> (%)	3.57±0.54	4.62±0.80*	5.09±0.55*
Kidney weight LT (gm)	5.77±1.31	7.59±0.49*	8.77±0.69*
RT	6.52±0.57	6.73±0.46	-

Values are the mean±SEM of 10-12 experiments. Sham, sham-operated normotensive rabbits; 2K1CGH, two-kidney one clip Goldblatt hypertensive rabbits; NEPHX, unilateral nephrectomized rabbits; BP, blood pressure; UV, urine volume; C<sub>PAH</sub>, C<sub>C</sub>, C<sub>H<sub>2</sub>O</sub>, clearance of para-aminohippuric acid, creatinine and free water, respectively; U<sub>Na</sub>V, U<sub>K</sub>V, excreted amount of sodium and potassium, respectively; FE<sub>Na</sub>, fractional excretion of sodium; LT, RT, left and right kidney. \*Significantly different from sham-operated rabbits, p<0.01



**Fig. 1.** Effects of acetylcholine(ACh) on the renal function in sham-operated normotensive rabbits. Acetylcholine was infused into left renal artery during the third period. *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (NAME, 0.5-5.0mg/kg/min) was infused during the third and fourth periods and acetylcholine(0.1ug/kg/min) was simultaneously infused during the fourth period. Closed dots indicate experimental left kidney and open dots indicate control right kidney. UV, urine volume;  $C_{PAH}$ ,  $C_{Cr}$ , clearance of paraaminohippuric acid and creatinine, respectively. \*Significantly different from control value,  $p < 0.01$ .

23G PE관을 13.5cm 정도 상방으로 삽입하여 양측 신동맥 분지사이에 cannula의 경사진 끝이 좌측으로 위치하도록 하고 이를 Harvard infusion pump에 연결하여 생리 식염수를 0.1mL/min의 속도로 주입하였다. 집뇨를 위해 하복부에 중앙 절개를 하여 요관을 노출시키고 silicone관을 삽입하여 양측 요를 분리하여 채취하였다.

## 2) 좌측 신동맥 내 약물 투여 방법

3시간 동안 hydration 시켜 요량이 일정하게 된 후 좌측 신동맥 내 직접 약물 투여를 위해 대동맥 내의 cannula 위치를 확인하였다. Sham 수술군에서 cannula 끝의 위치를 확인한 방법은 paraaminohippuric acid(PAH) 용액을 대동맥 내의 cannula에 10분간 주입하면서 2분 간격으로 채뇨하고 양측 신장의 PAH 배설량의 비율을 비교하였으며 PAH 배설량의 비율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Ratio of PAH extraction} = \frac{L(U_{PAH}V)}{R(U_{PAH}V)}$$

$U_{PAH}V$ : 요 중 PAH 배설량, L, R: 좌, 우측 신장

일측 신장 절제군과 신성 고혈압군에서의 cannula의 위치 확인은 요 중 나타나는 PAH의 배설량으로 하였으며 매 실험이 끝난 후 부검하여 cannula 끝의 위치를 확인하였다.

## 3) 집뇨방법 및 약물투여

좌측 신동맥 분지 앞에 cannula의 위치가 확인된 후 PAH 8mg/kg을 초기 투여하고 실험 초기부터 주입해 온 저장성 용액(glucose 3%, NaCl 0.3%, creatinine 0.3%)에 PAH 0.04%를 첨가하여 hydration 시켰다. 요량이 일정하게 되면 10분 간격으로 양측 요를 3-4회 집뇨하여 대조치로 사용하였으며, 10분간 약물을 투여하고 계속하여 5-6회 집뇨하였다. 혈장 creatinine과 PAH 측정을 위한 채혈은 실험이 끝난 후 대동맥에 삽입된 PE관을 통하여 실시하였으며 채

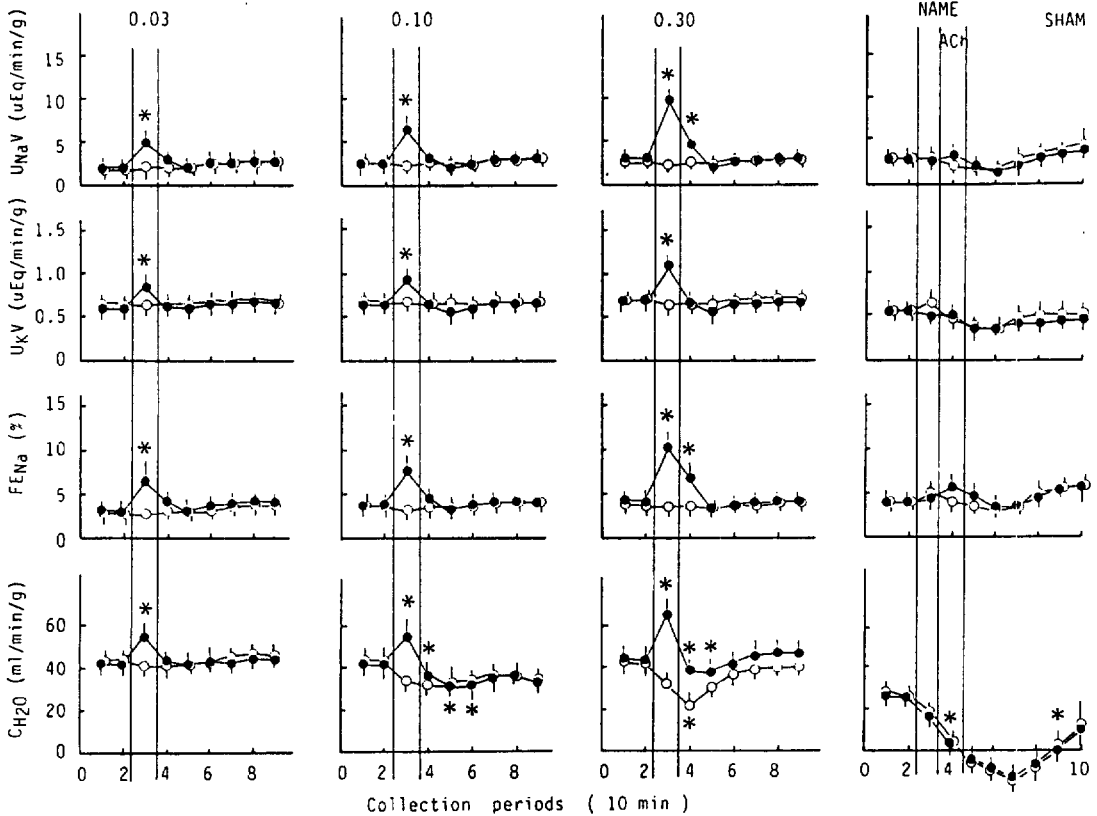


Fig. 2. Effects of acetylcholine on the renal function in sham-operated normotensive rabbits.  $U_{NaV}$ ,  $U_{KV}$ , urinary excreted amount of sodium and potassium, respectively;  $FE_{Na}$ , fractional excretion of sodium,  $CH_2O$ , free water clearance. Other legends are the same as in Fig. 1.

혈 후 즉시 4°C 하에서 원심 분리하였다.

Acetylcholine은 대퇴동맥 cannula를 통해 0.03, 0.1 그리고 0.3ug/kg/min(신장 내 실제 주입된 양 0.01, 0.03 그리고 0.1ug/kg/min)의 속도로 10분간 투여하였으며, nitric oxide synthase inhibitor인 *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)를 0.5-5.0 mg/kg/min(신장 내 실제 주입된 양 0.17-1.7mg/kg/min)로 10분간 전처치한 후 acetylchoine 0.1ug/kg/min(신장 내 실제 주입량 0.03ug/kg/min)를 투여하였다. 상기한 약물은 일정한 비율로 inulin이 들어있는 용액에 녹인 후 투여하여 실제 일측 신동맥 내로 투여된 양은 요 중 배설되는 inulin 양을 측정하여 산출하였다<sup>14)</sup>. 약물 투여 전과 약물 투여 후에는 생리 식염수를 계속해서 주입하였다.

#### 4) 화학 분석

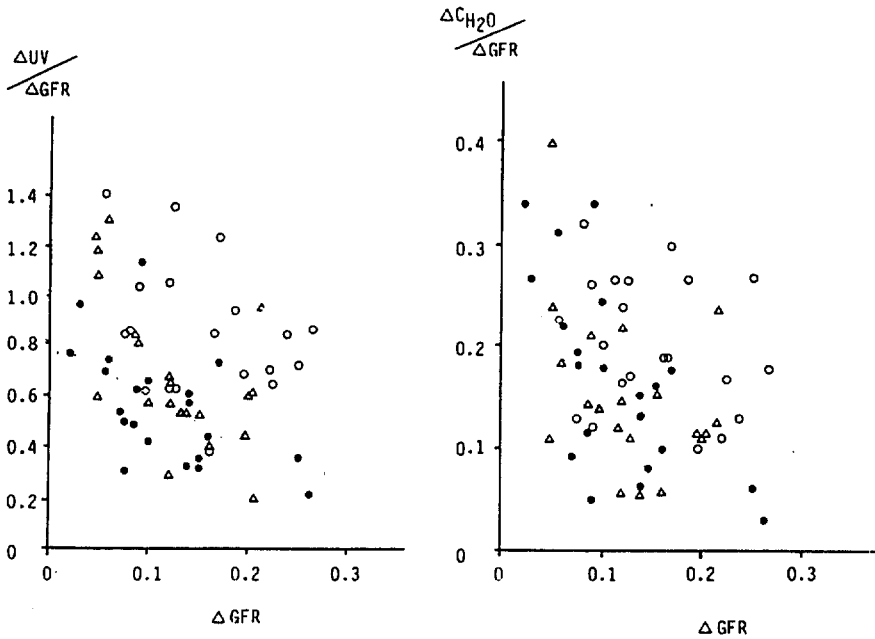
채집한 요와 혈액 성분의 화학 분석은 일반적인 방법에 의하였으며<sup>13)</sup> 신기능의 여러 척도는 신장의 단

위무계를 기초로 하였다.

요 중 nitric oxide의 측정은 Granger 등<sup>15)</sup>의 방법을 이용하여 요 중 nitrate를 측정하였다. 96 well plate에 50uL의 요와 50uL의 nitrate reductase 용액을 첨가하고 37 C에서 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에 90분간 반응시켰다. 이를 1000×g에서 10분간 원심 분리하고 50uL의 상층액에 100uL의 발색 용액(sulfanilamide in 30% acetic acid:0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 60% acetic acid=1:1)을 첨가하여 10분간 실온에 방치한 후 plate reader (MR<sup>700</sup> Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA)를 사용하여 540nm에서 발색 정도를 측정하였다.

#### 3. 통계 처리

실험의 통계 처리는 Student's t-test에 의하였으며, p가 최소 0.05를 유의한 차이의 한계로 삼았다. 실험치의 표현은 mean±SE로 하였다.



**Fig. 3.** Relation between changes in glomerular filtration rate( $C_{Cr}$ ), urine volume and free water clearance( $C_{H_2O}$ ) in sham-operated(●), unilateral nephrectomized(△) and hypertensive rabbits(○). There were significant linear correlations between those parameters in sham-operated and unilateral nephrectomized groups but not in hypertensive group( $\Delta UV/\Delta GFR$  vs  $\Delta GFR$ , sham,  $y = -2.05 \times +0.8$ ,  $r = 0.56$ ,  $p < 0.01$ ; Nephrectomized group,  $y = -3.23 \times +1.09$ ,  $r = 0.59$ ,  $p < 0.01$ )( $\Delta C_{H_2O}/\Delta GFR$  vs  $\Delta GFR$ , sham group,  $y = -1.01 \times +0.28$ ,  $r = 0.66$ ,  $p < 0.005$ ; Nephrectomized group,  $y = -0.86 \times +0.27$ ,  $r = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ).

## 결 과

### 1. 정상 혈압 가토의 신혈류 역학에 미치는 acetylcholine의 영향

정상 혈압 가토의 혈압은 평균 106.3mmHg 이었으며, 실험신장(좌측)의 사구체 여과율( $C_{Cr}$ )과 신혈장류량( $C_{PAH}$ )은 각각 평균 0.56과 2.48mL/min/g of kidney weight 였다(Table 1). 여과 분획은 평균 23.3%이었다. 좌측신장 내 acetylcholine 0.03-0.3ug/kg/min 투여는 용량 의존적으로  $C_{Cr}$ 과  $C_{PAH}$ 의 유의한 증가를 일으켰다(Fig. 1, 6). 이때 여과 분획은 영향받지 않았다. Nitric oxide 합성억제제 인 L-NAME의 전처리 는 acetylcholine 0.1ug/kg/min의 혈류역학적 효과를 차단하였다.

### 2. 정상 혈압 가토의 신 세뇨관 기능에 미치는 acetylcholine의 영향

Acetylcholine 투여 전의 요량,  $C_{H_2O}$ ,  $U_{NaV}$  및  $FE_{Na}$ 는 각각 평균 0.084mL/min/g, 43.19 $\mu$ L/min/g, 2.49 uEq/min/g, 그리고 3.57%이었다(Table 1). 실험내 acetylcholine 투여는 용량 의존적으로 신 세뇨관 기능의 유의한 증가를 일으켰다(Fig. 1, 2, 6). Acetylcholine 0.3ug/kg/min 투여시 반대측 신장의 요량은 감소하는 경향을 보였으며 투여 정지 후 반대측 신장의  $C_{H_2O}$ 의 유의한 감소를 관찰하였다. Acetylcholine 투여에 의한 요량과  $C_{H_2O}$  증가의 기전은 사구체여과율의 증가를 경유하지는 않았다(Fig. 3). Acetylcholine 투여 전 신장 내 L-NAME의 전처리는 상술한 acetylcholine의 신장 효과를 모두 차단하였으며, 두 약물 투여정지 후 요량 및  $C_{H_2O}$ 의 감소 효과가 양측 신장에서 관찰되었다. Acetylcholine과 L-NAME의 투여에 의한 전신 혈압의 유의한 변동은

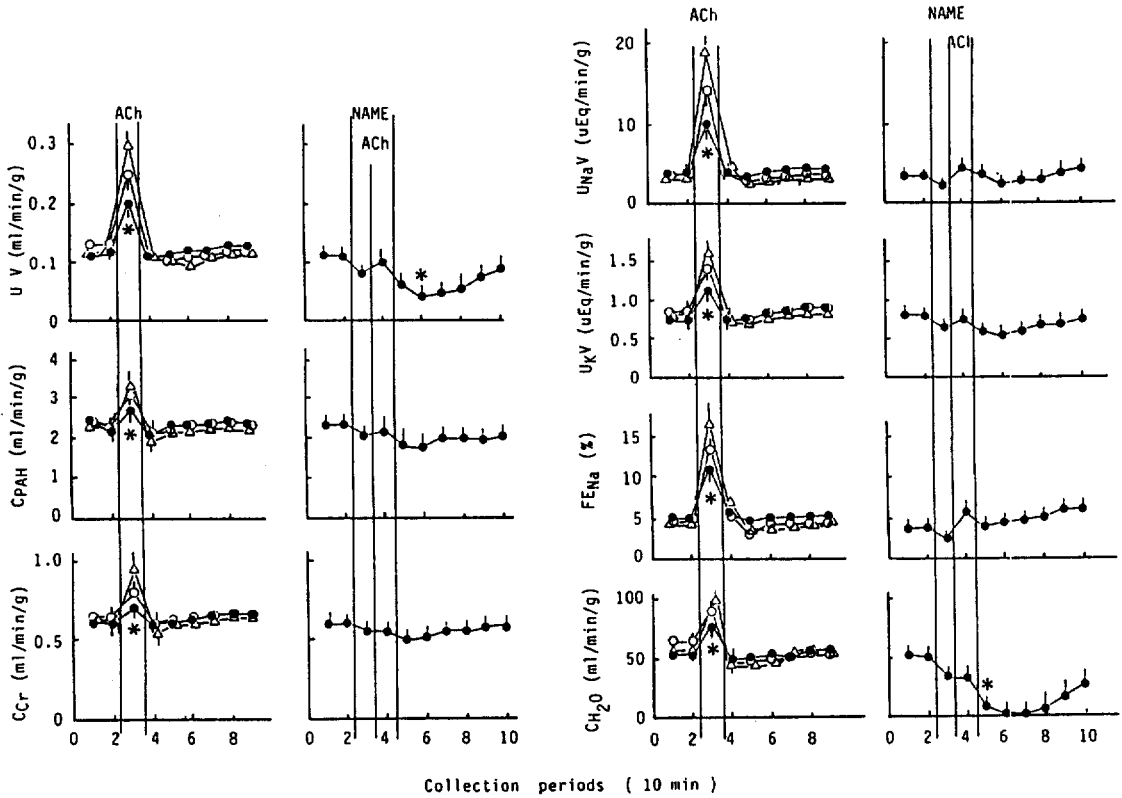


Fig. 4. Effects of acetylcholine on the renal function in two-kidney one clip Goldblatt hypertensive rabbits. Acetylcholine was infused into contralateral unclipped kidney at a rate of 0.03(●), 0.1(○) and 0.3(△) ug/kg/min. Other legends are the same as in Fig. 1.

관찰되지 않았다.

### 3. 신성 고혈압 가토의 신혈류 역학에 미치는 acetylcholine의 영향

우측 신동맥 결찰로 혈압이 상승한 가토(2K1C GHR)의 전신 혈압은 평균 132.9mmHg이었으며, clip 을 가하지 않은 좌측 신장의  $C_{Cr}$ 과  $C_{PAH}$ 는 각각 평균 0.67과 2.27mL/min/g로 정상 혈압 가토나 우측 신장 절제 가토의 그것과 차이가 없었다(Table 1). 신성 고혈압 가토의 좌측 신장의 무게는 평균 7.59g으로 정상 혈압 가토의 동측 신장 무게와는 유의한 차이를 보였다. 좌측 신장 내 acetylcholine 0.03-0.3ug/kg/min 투여는 용량 의존적으로  $C_{Cr}$ 과  $C_{PAH}$ 의 증가를 일으켰으며(Fig. 4, 6), acetylcholine의 신혈류 역학적 효과는 정상 혈압 가토의 그것과 유의한 차이가 없었다. Acetylcholine의 효과는 L-NAME의 전처리에 의하여 차단되었다

### 4. 신성 고혈압 가토의 신 세뇨관 기능에 미치는 acetylcholine의 영향

Acetylcholine 투여 전의 clip을 가하지 않은 좌측 신장의 요량,  $CH_2O$ ,  $U_{NaV}$  및  $FE_{Na}$ 는 각각 평균 0.13 mL/min/g, 58.89uL/min/g, 3.44uEq/min/g 그리고 4.62 %로 sham 군과는 유의한 차이를 보였다(Table 1). 결찰 반대측 신장 내 acetylcholine 투여는 용량 의존적으로 요량,  $CH_2O$ ,  $U_{NaV}$ ,  $U_{KV}$  그리고  $FE_{Na}$ 의 현저한 증가를 보였으며 정상 혈압군의 그것과 유의한 차이를 보였다(Fig. 4-6). Acetylcholine의 이러한 효과는 L-NAME 전처리에 의하여 모두 차단되었으며, 두 약물 투여 정지 후 요량과  $CH_2O$  감소 효과는 정상 혈압군에서와 마찬가지로 나타났다. Acetylcholine과 L-NAME의 신장 내 투여는 전신 혈압에 영향을 미치지 않았다.

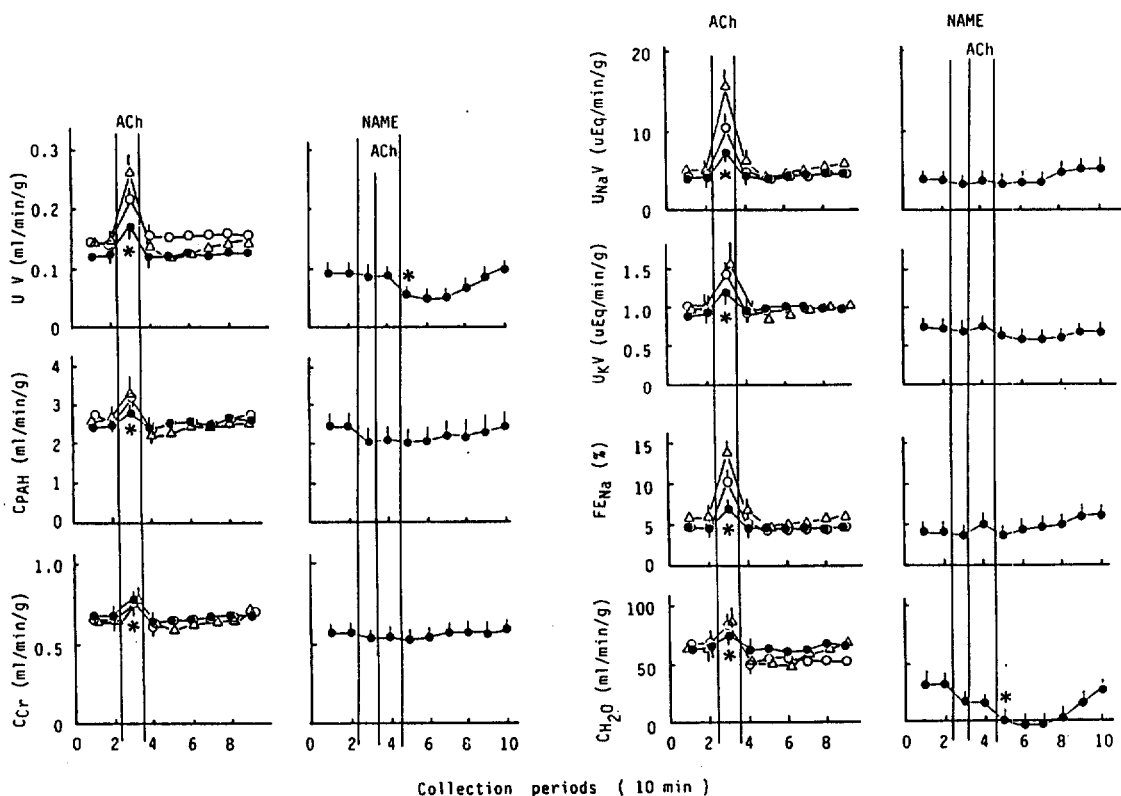


Fig. 5. Effects of acetylcholine on the renal function in unilateral nephrectomized rabbits. Legends are the same as in Fig. 4.

### 5. 일측 신장 절제 가토의 신혈류역학 및 세뇨관 기능에 미치는 acetylcholine의 영향

신성 고혈압 가토에서 우측 신동맥의 협착으로 인한 배설 기능의 감소로 인해 반대측 신장의 비대가 나타나므로 강화된 acetylcholine의 신장효과가 신장의 비대 때문인지 높은 압력 때문인지를 구분하기 위해 우측 신장을 절제한 가토를 다른 대조군으로 사용하였다. 일측 신장 절제로 인하여 혈압은 sham 수술군과 유의한 차이가 없었으며 요량, 전해질 배설량 및 유리수분 배설량은 sham 수술군에 비해 현저히 증가하였다(Table 1). 좌측 신장 내 acetylcholine 0.03-0.3ug/kg/min 투여는 용량 의존적으로 신혈류역학 및 신 세뇨관 기능의 증가를 일으켰으며(Fig. 5, 6), acetylcholine의 신장 효과는 sham 수술군의 그것과 유의한 차이가 없었다. Acetylcholine의 이러한 효과는 L-NAME 전처리에 의하여 모두 차단되었으며, 두 약물 투여 정지 후 요량과 CH<sub>2</sub>O 감소 효과는 sham

수술군에서와 마찬가지로 나타났다.

### 6. 요 중 Nitric oxide의 분비에 미치는 acetylcholine의 영향

요 중으로 배설되는 nitrate 양(U<sub>NO<sub>3</sub>V</sub>)은 세 군 모두에서 acetylcholine 투여에 의하여 유의한 증가를 보였으며, L-NAME 투여 후에는 acetylcholine에 의한 U<sub>NO<sub>3</sub>V</sub> 증가는 차단되었다(Fig. 7). Acetylcholine에 의한 U<sub>NO<sub>3</sub>V</sub> 증가는 고혈압군에서 정상 혈압군에 비해 강화되는 경향을 보였다.

## 고 찰

가토의 신동맥 내 acetylcholine 투여는 용량 의존적인 요량, 요 중 전해질 배설량 및 신혈장류량 등의 증가 그리고 사구체여과율의 증가를 일으켰다. Acetylcholine 투여에 의한 FE<sub>Na</sub>의 증가는 요 중 전해질 배설량 증가의 기전으로 신 세뇨관의 효과가 존재함

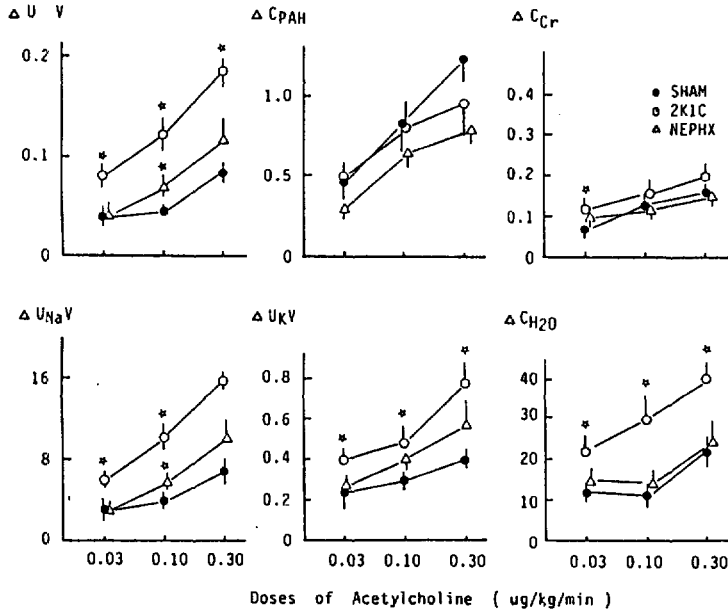


Fig. 6. Dose-response curve of renal effects of acetylcholine in sham-operated (●), unilateral nephrectomized (Δ) and hypertensive rabbits (○). Legends are the same as in Fig. 1 and 2. \*: significantly different from sham-operated rabbits,  $p < 0.05$ .

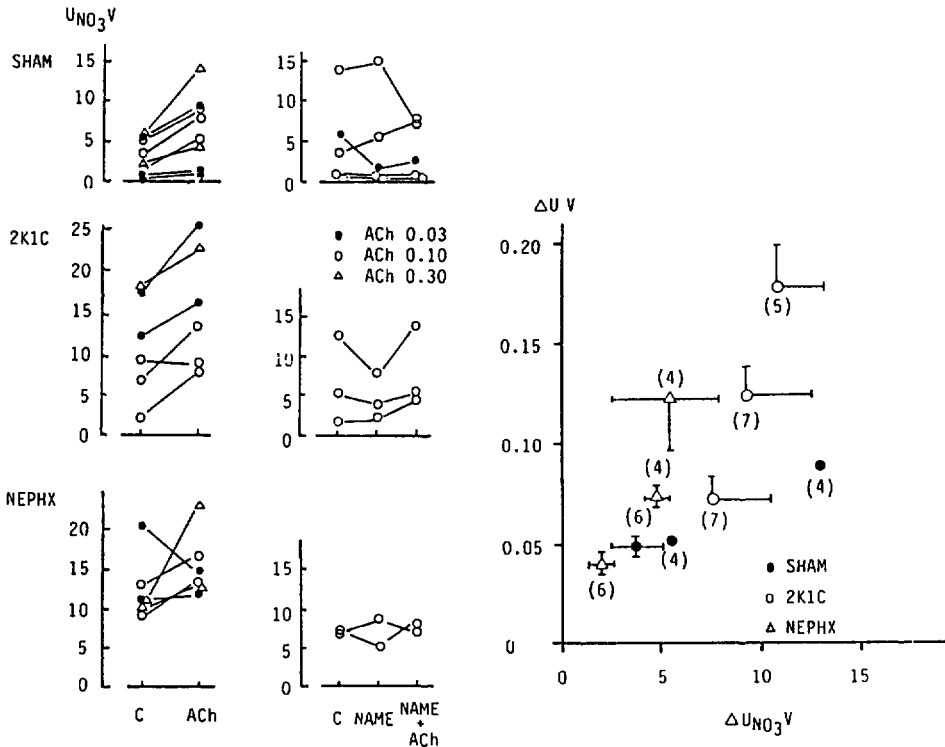


Fig. 7. Changes in urinary excretion of nitrate by acetylcholine in the absence and presence of  $N\omega$ -nitro-L-arginine-methyl ester (NAME).

을 암시하고 있다. 또한 유리수분 배설량의 증가는 집합관에 대한 acetylcholine의 효과를 보여 주는 것이다. 이 연구에서 사용한 acetylcholine의 양 0.03-0.3 ug/kg/min는 다른 연구자들의 사용량보다는 낮았다. 또한 사용한 양 범위에서 acetylcholine에 의한 전신혈압의 변동은 관찰되지 않았다.

콜린성약물에 의한 이뇨 효과는 혈관 이완에 의하여 나타날 것이라고 일찍이 알려져 있으나, 신세뇨관의 기능 조절을 경유하여 나타날 수 있는 가능성도 배제되지는 않았다. 즉 acetylcholine(또는 carbachol)은 사구체 여과율의 변화없이 신혈류량의 증가와 여과 분획의 감소를 일으키고 Starling forces의 불균형을 초래하여 요량과 요 중 Na 배설량( $U_{Na}V$ )의 증가를 일으킨다는 것이다<sup>3, 4</sup>. 그러나 신장 내 혈관 분포의 해부학적 특성을 응용한 닭에서의 연구<sup>16</sup>, 파충류의 방광에서의 carbachol의 연구<sup>5, 6</sup> 그리고 포유 동물의 근위 세뇨관에서의 연구결과<sup>17</sup> 등은 acetylcholine이 신세뇨관으로부터의 Na 재흡수를 억제할 수 있을 것이라는 추측을 가능케 하였다. 또한 집합관에서의 콜린성 수용체의 발견<sup>18, 19</sup>과 항이뇨 호르몬(antidiuretic hormone, ADH)에 의한 수분의 이동에 콜린성 약물이 억제적인 역할을 한다는 보고<sup>20</sup>는 acetylcholine에 의한 유리 수분 배설 증가 현상을 설명할 수 있게 하였다.

이 연구에서와 같이 acetylcholine에 의한 사구체 여과율의 증가는 흥미있는 결과이다. 개를 사용한 연구와 일부 사람에서의 결과는 acetylcholine에 의한 사구체 여과율의 증가가 관찰되지 않았다<sup>21-26</sup>. 그러나 백서에서는 이와는 다르게 신혈류량의 증가뿐만 아니라 사구체 여과율의 증가도 발견되어<sup>7</sup> 이 연구의 결과와 유사함을 보여주었으며 acetylcholine의 신혈류역학적 영향은 동물의 종간에 차이가 있음을 암시하였다. 이 연구 결과로 알 수 있는 바와 같이 acetylcholine 투여에 의하여 신 혈장류량의 증가와 더불어 나타난 사구체 여과율의 증가는 여과 분획에는 큰 영향을 미치지 않았으며 신세뇨관에서의 수분 및 전해질 재흡수의 기전이 억제되어 있을 것이라는 추측을 가능케 하며  $FE_{Na}$ 의 증가와 유리 수분 배설량의 증가는 이를 뒷받침하였다. 이러한 결과는 선행한 다른 연구자들<sup>5, 6, 16, 17</sup>의 추측과 일치되는 것이다.

Acetylcholine의 신장 효과에 관한 초기의 연구에

서 그 기전이 콜린성 수용체를 경유할 것이라는 견해가 제시되었다<sup>3</sup>. Furchgott와 Zawadzki는<sup>8</sup> 혈관 내피 세포를 경유하는 acetylcholine의 혈관 평활근 이완 현상을 처음 발견하였고 acetylcholine의 이러한 특성은 콜린성 muscarine 수용체를 경유함도 밝혀졌다<sup>8, 9</sup>. 그 후 acetylcholine에 의한 혈관 평활근의 이완은 nitric oxide에 의하여 나타남이 더욱 밝혀지게 되었으며<sup>27, 28</sup>, 생화학적으로 이 과정을 선택적으로 차단 할 수도 있게 되었다<sup>29-31</sup>.

이 연구에서 사용한 L-NAME는 acetylcholine의 모든 신장 효과를 차단하였으며 따라서 acetylcholine에 의한 신장 효과는 nitric oxide를 경유함이 확실하고 이는 선행한 다른 연구 결과와<sup>23</sup> 부분적으로 일치하였다. 그러나 개에서 acetylcholine에 의한 신장 효과가 nitric oxide의 경로뿐만 아니라 prostaglandin계와도 관련이 있다는 연구와는<sup>25</sup> 차이가 있으며, acetylcholine에 의한  $U_{Na}V$  증가 효과가 nitric oxide계 차단에 의하여 차단되지 않는다는 보고<sup>23</sup>와는 일치되지 않는다. L-NAME에 의하여 acetylcholine의 신세뇨관 효과 및 혈류역학적 반응이 모두 차단되고 있음은 acetylcholine의 효과가 신 세뇨관의 콜린성 수용체를 경유하지는 않을 것이라는 추측도 가능하다. 돼지의 신장상피세포 세포주(LLC-PK1)에서 arginine-NO계의 존재 가능성이 제시되었으나<sup>32, 33</sup> 신세뇨관 상피 세포의 콜린성 수용체가 nitric oxide와 관련되어 있다는 증거가 확실하지 않기 때문에<sup>34</sup> 이 작용점을 경유하는 신장 효과가 L-NAME에 의하여 차단될 것 같지는 않다. 초기의 연구자들에 의하여 보고된 acetylcholine의 신장 효과가 atropine에 의하여 차단된다는 사실은, acetylcholine에 의한 nitric oxide의 유리 기전이 콜린성 수용체를 경유하여 나타난다는 점을<sup>8, 9</sup> 생각할 때에, acetylcholine의 신장 효과가 혈관 내피 세포의 기능에 의하여 나타나고 있을 가능성을 강하게 암시하는 것이다. 이 연구에서 보는 바와 같이  $FE_{Na}$ 의 증가와 같은 신 세뇨관의 효과는 acetylcholine의 직접 작용이라기보다는 acetylcholine에 의한 nitric oxide의 유리와 확산에 의한 신세뇨관 상피 세포에 대한 효과로 추측된다. 즉 acetylcholine에 의하여 유리된 nitric oxide에 의한 혈관 평활근의 이완, 신혈장류량 및 사구체 여과율의 증가와 세뇨관에서의 직접 작용 등에 의하여  $Na^+$  및 수분 재흡수의 억제가 일어날 수 있을 것이다. 또한 acetylcholine의 신

장효과에서 제시된 바와 같이<sup>23)</sup> nitric oxide 작용에 의하여 신 수질부의 혈류량이 증가한다면 “medullary wash-out”에 의한 요 농축능의 감소를 일으킬 것이다. Nitric oxide의 집합관 상피세포에 대한 직접 작용의 가능성은 배제될 수 없을 것이다. 비록 콜린성 약물에 의하여 집합관에서 ADH로 인한 수분의 이동이 억제되거나<sup>20)</sup>, phosphoinositides의 대사산물 등에 의한 효과가<sup>19)</sup> 있다하여도 acetylcholine에 의한 유리수분 배설 증가 효과가 L-NAME에 의하여 차단되는 이 연구의 결과로는 acetylcholine의 집합관 상피세포에 대한 직접 효과는 배제될 수 있을 것 같다. 이 연구에서 관찰된 L-NAME와 acetylcholine 투여 정지 후의 전신 효과로 나타나는 요량 및 유리수분배설의 감소 효과의 기전은 이 연구만으로는 아직 알 수 없다.

지금까지의 많은 실험 예에서 고혈압에서는 acetylcholine에 의한 혈관 이완 반응이 억제되어 있음이 보고되었다<sup>10, 11, 35-38)</sup>. Acetylcholine의 혈관내피 세포를 경유하는 혈관 반응은 endothelium-derived relaxing factor(EDRF), endothelium-derived hyperpolarizing factor 또는 endothelium-derived contracting factor(EDCF) 등을 경유하여<sup>10-12, 39, 40)</sup> 효과기 세포에 영향을 나타내고 있음이 알려졌다. 이 연구에서는 가토의 신성 고혈압 초기에 acetylcholine에 의한 요량, 전해질 배설량 및 유리수분 배설량 등은 크게 향진되어 있으나, 신혈장류량과 사구체여과율은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉 높은 압력에 노출된 2K1C 고혈압 가토의 결찰 반대측 신장의 acetylcholine에 의한 혈류역학적 반응은 sham 수술군과 일측 신장 절제군의 그것과 유의한 차이를 보이지 않았다. 많은 고혈압 동물 실험에서 대동맥의 acetylcholine에 의한 혈관 이완 반응성은 억제되어 있으나, 대퇴 동맥의 그것은 오히려 강화되어 있다는 사실을<sup>36)</sup> 생각할 때에 혈관에 따라서는 acetylcholine에 대한 반응성에 차이가 있을 수 있음이 예측되며, 동물의 종에 따라서, 고혈압의 종류에 따라서 또는 실험 방법에 따라서<sup>41)</sup> 혈관 반응성에 차이가 있을 것이라는 추측이 가능하다. 또한 본태성 고혈압 백서(SHR)의 대동맥을 사용한 실험에서 acetylcholine에 의한 혈관 이완의 억제는 EDRF의 감약된 유리때문이라고 EDCF의 유리 때문일 것이라는 보고는 acetylcholine의 혈관 이완 변조의 기전이 다양함을 암시

하는 것이다<sup>10)</sup>. 더욱이 생체의 실험과 체내 실험의 결과는 차이가 있을 것이다.

이 연구의 결과 신성 고혈압 가토의 혈류 역학적 반응과는 다르게 acetylcholine에 대한 세뇨관의 반응성은 크게 향진되어 있음이 제시되었다. 이러한 변화는 acetylcholine에 의한 EDRF/nitric oxide의 유리(L-NAME에 의하여 차단되므로), 확산, 효과기 세포 내 cGMP의 생성과정과 그 이후의 세포 내 여러 단계의 반응성 그리고 혈관 내피 세포의 콜린성 muscarine 수용체의 변화 등에 의하여 나타날 것이나 이 연구 만으로서는 아직 그 정확한 기전을 알 수 없다. 신성고혈압군에서 요 중 nitrate 배설량이 많은 경향을 보이는 것은 acetylcholine에 의한 nitric oxide 생성량이 증가되어 있을 가능성을 시사하는 것이다.

= Abstract =

**Effects of Acetylcholine on the Renal Function in Renal Hypertensive Rabbits**

Seung Moo Noh, M.D.\*, Suhm Hee Kim, M.D. and Kyung Woo Cho, M.D.

Department of General Surgery\*,  
College of Medicine, Chungnam National University,  
Daejun Department of Physiology, Medical School,  
Institute for Medical Sciences  
Jeonbuk National University, Cheonbuk, Korea

It has long been known that acetylcholine infusion resulted in increases in urine volume, urinary excretion of Na and renal plasma flow. Exact mechanism of renal effects of acetylcholine, however, has not yet been clarified. Since the discovery of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide system, the vascular endothelium has been considered as an endocrine gland. The purpose of the present study was to define the effect of acetylcholine on the renal hemodynamic and tubular function, and the modification of the renal effects of acetylcholine in two-clip Goldblatt hypertensive rabbits.

Intrarenal acetylcholine(0.03-0.3ug/kg/min) increased glomerular filtration rate(GFR,  $C_{Cr}$ ), renal plasma flow(RPF,  $C_{PAH}$ ), urine volume(UV), free water clearance( $C_{H_2O}$ ), urinary excretion of electrolytes( $U_{Na}V$ ,  $U_{K}V$ ) and nitrate( $U_{NO_3}V$ ) and fractional excretion of  $Na^+$  ( $FE_{Na}$ ) in unanesthetized rabbits. No change in filtration fraction was observed. Pretreatment with  $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) blocked the acetylcholine-induced renal effects.

Acetylcholine infused into the contralateral kidney elicited increases in GFR, RPF, UV,  $C_{H_2O}$ ,  $U_{Na}V$ ,  $U_{K}V$ ,  $U_{NO_3}V$  and  $FENa$  in hypertensive rabbits. The hemodynamic effect was not different between normotensive sham-operated and unilateral nephrectomized rabbits. Acetylcholine-induced tubular effect, however, was significantly accentuated in hypertensive rabbits. Neither the renal hemodynamic nor tubular effects of acetylcholine were observed with pretreatment of L-NAME.

These results suggest that the renal tubular effect as well as hemodynamic effect of acetylcholine is mediated through the NO system and that the tubular effect of acetylcholine is accentuated in the early phase of renal hypertension.

**Key Words** : Acetylcholine, Nitric oxide, Rabbit, Renal function, Renal hypertension

### 참 고 문 헌

- 1) Pirola CH, Alvarez AL, Balda MS, Finkielman S, Nahmod VE: Evidence for cholinergic innervation in dog renal tissue. *Am J Physiol* 257:F746-F754, 1989
- 2) Garg LC: Actions of adrenergic and cholinergic drugs on renal tubular cells. *Pharmacol Rev* 44: 81-102, 1992
- 3) Vander AJ: Effects of acetylcholine, atropine and physostigmine on renal function in the dog. *Am J Physiol* 206:492-498, 1964
- 4) Earley LE, Friedler RM: Studies on the mechanism of natriuresis accompanying increased renal blood flow and its role in the renal response to extracellular volume expansion. *J Clin Invest* 44: 1857-1865, 1965
- 5) Wiesmann W, Sinha S, Yates J, Klahr S: Cholinergic agents inhibit sodium transport across the isolated toad bladder. *Am J Physiol* 235:F564-F569, 1978
- 6) Sahib MK, Schwartz JH, Handler JS: Inhibition of toad urinary bladder sodium transport by carbamylcholine: Possible role of cyclic GMP. *Am J Physiol* 235:F586-F591, 1978
- 7) Lameire N, Vanholder R, Ringoir S, Leusen I: Role of medullary hemodynamics in the natriuresis of drug-induced renal vasodilation in the rat. *Circ Res* 47:839-844, 1980
- 8) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 9) Furchgott RF: Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 53: 557-573, 1983
- 10) Luescher TF, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8:344-348, 1986
- 11) Vanhoutte PM: Endothelium and control of vascular function. State of the art lecture. *Hypertension* 13:658-667, 1989
- 12) Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T: Prostaglandin  $H_2$  may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 15:475-481, 1990
- 13) Ma JS, Cho KW, Kim SH, Koh GY, Seo MW: Effects of unilateral renal arterial infusion of adenosine and its analogues on renal function in two-kidney one clip hypertensive rabbits. *Kor J Physiol* 24:145-159, 1990
- 14) Cho KW, Koh GY, Kim SH, Seul KH: Unilateral renal arterial infusion and renal vein catheterization in rabbits. *Renal Physiol* 10:93-101, 1987
- 15) Granger DL, Hibbs JB Jr., Perfect JR, Durack, D.T: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 85:264-273, 1990
- 16) Parmalee ML, Carter MK: The diuretic effect of acetylcholine in the chicken. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 174:108-117, 1968
- 17) Stein JH, Reineck JH, Osgood RW, Ferris TF: Effect of acetylcholine on proximal tubular sodium reabsorption in dog. *Am J Physiol* 220:227-232, 1971
- 18) McArdle S, Garg LC, Crews FT: Cholinergic receptors in renal medullary collecting duct cells. *J Pharmacol Exp Ther* 248:12-16, 1989
- 19) McArdle S, Garg LC: Cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in renal medullary collecting duct cells. *J Pharmacol Exp Ther* 248: 682-686, 1989
- 20) Snyder HD, Fredin DM, Breyer MD: Muscarinic receptor activation inhibits AVP-induced water flow in rabbits cortical collecting ducts. *Am J Physiol* 260:F929-F936, 1991
- 21) Thomas CE, Ott CE, Bell RD, Knox FG, Navar LG: Glomerular filtration dynamics during renal vasodilation with acetylcholine in the dog. *Am J Physiol* 244:F606-F611, 1983
- 22) Yun JCH, Gill JR Jr, Ho SS, Kelley GD, Keiser HR: Prostaglandin E2 but not F2 restores the natriuretic response to acetylcholine in indomethacin-

- treated dogs. *Am J Physiol* 247:F185-191, 1984
- 23) Laera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ, Raji L, Romero JC : Effects of NG-monomethyl-L-arginine and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension* 15:659-663, 1990
- 24) Tolins JP, Palmer RM, Moncada S, Raji L : Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic response. *Am J Physiol* 258:H655-H662, 1990
- 25) Salom MG, Lahera V, Romero JC : Role of prostaglandins and endothelium-derived relaxing factor on the renal response to acetylcholine. *Am J Physiol* 260:F145-F149, 1991
- 26) Yun JCH, Oriji G, Gill JR Jr, Coleman BR, Peters J, Keiser HR : Role of muscarinic receptors in renal response to acetylcholine. *Am J Physiol* 265:F46-F52, 1993
- 27) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G : Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269, 1987
- 28) Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S : L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153:1251-1256, 1988
- 29) Palmer RMJ, Moncada SA : novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:348-352, 1989
- 30) Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S : A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Brit J Pharmacol* 96:418-424, 1989
- 31) Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S : Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3375-3378, 1989
- 32) Schroeder H, Schoer K : Cyclic GMP stimulation by vasopressin in LLC-PK1 kidney epithelial cells is L-arginine-dependent. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 340:475-477, 1989
- 33) Ishii K, Chang B, Kerwin JF, Wagenaar FL, Huang ZJ, Murad F : Formation of endothelium-derived relaxing factor in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells : An intra- and intercellular messenger for activation of soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 256:38-43, 1991
- 34) Stoos BA, Carretero OA, Farhy RD, Scicli G, Garvin JL : Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport and increases cGMP content in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J Clin Invest* 89:761-765, 1992
- 35) Cauvin C, Pergram B : Decreased relaxation of isolated mesenteric resistance vessels from 2-kidney, 1 clip Goldblatt hypertensive rats. *Clin Exp Hyper-Theory and Practice* A5:383-400, 1983
- 36) Konish M, Su C : Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5:881-886, 1983
- 37) Winqvist RJ, Bunting PB, Baskin EP, Wallace AA : Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J Hypertension* 2:541-545, 1984
- 38) Lockette W, Otsuka Y, Carretero O : The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 8(suppl II):II61-II66, 1986
- 39) Feleton M, Vanhoutte PM : Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Brit J Pharmacol* 93:515-524, 1988
- 40) Taylor SG, Weston AH : Endothelium-derived hyperpolarizing factor : A new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol. Sci* 9:272-274, 1988
- 41) Li J, Bukoski RD : Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. *Circ Res* 72:290-296, 1993