

# 당뇨병 백서의 부신 Glomerulosa세포에서 Angiotensin II 자극후 인지질분해효소 활성의 변화

이화여자대학교 의과대학 내과학교실  
성 연 아

= Abstract =

## The Angiotensin II-Stimulated Phospholipase Activity in Adrenal Glomerulosa Cells of Diabetic Rats

Yeon-Ah Sung

*Department of Internal Medicine, Ewha Womans University Medical College*

**Objectives** : Diabetic patients develop hypoaldosteronism which frequently caused hyperkalemia and metabolic acidosis and diabetic hypoaldosteronism is associated with selective unresponsiveness of aldosterone to angiotensin II (A II), but mechanism of defect in A II stimulated aldosterone response still remain unclear.

To elucidate the mechanism of defect in A II stimulated aldosterone response and whether the defect was corrected by insulin treatment, author evaluated the responses of aldosterone production to A II, K<sup>+</sup> and ACTH. I also evaluated the products of phospholipase C(PLC) and phospholipase D(PLD) activation important for increase of intracellular calcium and protein kinase C activation after A II activation in adrenal glomerulosa cells prepared from streptozotocin induced diabetic rats.

**Methods** : Two weeks after induction of diabetes by streptozotocin, rats were sacrificed by decapitation. The aldosterone production to A II, K<sup>+</sup> and ACTH was measured by RIA. Inositol triphosphate(IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol(DAG) generated by activation of PLC and phosphatidic acid(PA), phosphatidylethanol(PEt) and DAG generated by activation of PLD were measured by anion exchange column and thin layer chromatography.

### **Results** :

1) Plasma renin activity and aldosterone level were not different among control rats, untreated and insulin treated diabetic rats.

2) Basal, ACTH and K<sup>+</sup>-stimulated aldosterone production were similar in cells from the three groups(p>0.05), but A II stimulated aldosterone production was significantly decreased in cells from untreated diabetic rats compared with control and insulin treated diabetic rats(p<0.05).

3) A II - induced IP<sub>3</sub>, PA, PEt and DAG generation was similar among the three groups(p>0.05).

**Conclusion :** These results suggested that decreased A II -stimulated aldosterone response was present in glomerulosa cells from strepzptocin induced diabetic rats and reversed by insulin treatments. The main defect of altered A II response of zona glomerulosa might be located in the step distal to the activation of phospholipase.

**KEY WORDS :** Hypoaldosteronism · Phospholipase · Angiotensin II .

## 서 론

당뇨병 환자의 50~60%에서 고혈압이 동반되고, 신장 기능 장애가 초래되며, 또한 원인을 알 수 없는 고칼륨혈증이 발생하는 것으로 보아 renin-angiotensin-aldosterone계의 이상이 나타날 수 있다는 추정을 할 수 있다. 이러한 renin-angiotensin-aldosterone계의 이상 중에서 저aldosterone혈증이 대표적으로 과거에는 renin의 감소에 따른 2차적인 현상으로 생각되었으나<sup>1)</sup> 그 이후 당뇨병에서 저aldosterone혈증을 보일때 혈중 renin농도는 정상이거나 상승되어 있다고 보고되어<sup>2-6)</sup> 그 원인으로 부신 glomerulosa세포자체의 결함이 대두되게 되었다. 또한 당뇨병에서 생리적으로 중요한 aldosterone 분비조절인자인 angiotensin II (A II), ACTH, K<sup>+</sup> 자극에 대한 glomerulosa세포의 aldosterone 분비양상도 다양하게 보고되어, Kogishi등<sup>5)</sup>은 당뇨병 환자의 basal과 A II, ACTH 자극 aldosterone의 분비가 감소되어 있다고 하였으나, Iwasaki등<sup>6)</sup>은 ACTH 자극 aldosterone분비반응은 정상대조군과 차이가 없다고 하였다. 당뇨병 유발 백서에서 혈중 renin 농도와 기저상태, A II, ACTH 및 K<sup>+</sup> 자극에 대한 aldosterone 분비가 모두 감소되어 있다고 한 반면<sup>6)</sup> 부신 glomerulosa세포를 분리하여 시험관내에서 행한 실험에서는 basal과 ACTH 자극 aldosterone분비는 정상 대조군과 차이가 없고, A II와 K<sup>+</sup> 자극에 대한 aldosterone 분비 반응은 감소된다고 하였다<sup>6,9)</sup>. 따라서 당뇨병에서 저aldosterone혈증은 A II 자극과 함께 ACTH와 K<sup>+</sup>의 자극에도 aldosterone분비가 이상을 보이는 것으로 보아 renin의 감소뿐 아니라 부신 glomerulosa세포자체의 결함이 그 원인임을 추정할 수 있다. 또한 당뇨병에 의한 glomerulosa세포의 aldosterone 분비이상인 인슐린의 투여로써 교정되므로 인슐린의 결핍이 glomerulosa세포 기능이상의 원인이 될 수 있을 것이며<sup>8)10)</sup> 이러한 인슐린의 작용은 인슐린수용체가 부신 glomerulosa세포에서 증명됨에 따라 세포막의 인슐린

수용체와 결합하여 나타날 수 있다<sup>11)</sup>.

Nadler등<sup>12)</sup>은 당뇨병 백서에서 부신 glomerulosa 세포의 basal과 ACTH, K<sup>+</sup> 자극aldosterone 분비반응은 오히려 증가되고, A II 자극 aldosterone 분비반응은 감소되며, 시험관내에서 인슐린의 투여에 의해 A II 자극 aldosterone 분비가 회복되는데 이때 arachidonic acid(AA)의 12-lipoxygenase 산물 12-hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE)가 증가되는 것을 관찰하여 A II 자극 aldosterone분비의 결함이 lipoxygenase계의 결함에 있음을 보고하였고 최근 Kim등<sup>13)</sup>은 당뇨병 백서에서 A II와 K<sup>+</sup>에 대한 aldosterone의 시험관내 분비반응이 저하되어 있으나 인슐린치료에 의해 회복되며 A II 자극 inositol triphosphate(IP<sub>3</sub>)의 생성은 대조군과 차이가 없어서 A II 자극 aldosterone분비의 결함이 IP<sub>3</sub>생성이후에 있을 것이라고 하였다. 이외에도 저 aldosterone혈증이 있는 당뇨병 백서에서 부신 glomerulosa 세포의 A II수용체의 수와 친화도는 정상대조군 차이가 없어서 당뇨병성 저 aldosterone 혈증의 기전이 되는 결함은 A II가 수용체 결합이후의 수용체후 과정에 있다고 보고된 바 있어<sup>14)</sup> 당뇨병의 저 aldosterone혈증, 즉 A II 자극 aldosterone 분비 반응의 결함은 A II수용체 결합이후의 세포내 과정, 특히 A II의 신호전달계에 기전이 있을 것으로 추정된다.

이와 같이 당뇨병에서 basal과 ACTH, K<sup>+</sup> 자극 aldosterone의 분비는 연구자마다 상이하게 보고되어 정립되어 있지 않고, A II 자극 aldosterone의 분비는 공통적으로 감소되어 있으나 A II 자극 aldosterone분비의 감소의 기전은 명확하지 않다.

본 연구는 당뇨병을 유발시킨 백서에서 생체와 시험관내 aldosterone분비의 변화양상을 관찰하고 A II 자극 aldosterone 분비의 감소가 세포막 신호전달계의 이상에 의해 나타나는지 밝히기 위해 A II 작용의 세포막 신호전달계중 세포내칼슘증가와 protein kinase C(PKC) 활성화에 중요한 phospholipase(PLC) 및 phospholipase D(PLD)의 활성의 변화를 관찰하여 당뇨병에서

A II 자극 aldosterone분비변화의 기전을 A II의 신호 전달계중 인지질분해효소활성화를 중심으로 밝히고 이러한 변화가 인슐린 치료에 의해 교정되는지 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구재료

체중 180~240g의 숫컷 Sprague-Dawley 쥐의 부신 glomerulosa세포를 실험재료로 사용하였으며 이들은 다음과 같이 세대조군으로 분류하였다.

1군 (50마리) : 정상대조군

2군 (50마리) : 당뇨병군

3군 (50마리) : 인슐린치료한 당뇨병군

실험기간 동안 일정한 사료와 물을 자유로이 섭취하도록 하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 당뇨병의 유발과 인슐린치료

Citrate buffer 0.5mmole을 함유한 0.9% saline (PH 4.5) 0.5ml에 streptozotocin 60mg/kg를 용해한 후 복강내 주사하여 당뇨병이 유발된 것을 1일 2회 미첨부 출혈에 의해 혈당을 측정함으로써 확인하였다. 3군에서 당뇨병이 유발된 2주 후부터 1U/kg로 중간 작용형 인슐린을 투여하기 시작하여 전날의 혈당농도를 기준으로 용량을 조절하면서 매일 오전 9시에 투여하였다. 이들을 실험시작 2주후, glomerulosa세포의 aldosterone분비반응을 측정하기 위해 각 군당 6마리씩, IP<sub>3</sub>, AA, phosphatidic acid(PA), diacylglycerol(DAG), phosphatidylethanol(PEt)을 측정하기 위한 실험에는 각군을 8마리씩 동일한 시각에 경부절단에 의해 희생시켰다.

#### 2) 혈중 renin, aldosterone, 인슐린의 측정

경부절단에 의해 쥐를 희생시키면서 나오는 체부의 혈액을 채취하여 renin 측정을 위한 혈액은 미리 냉각시킨 EDTA tube에 넣고, aldosterone과 인슐린측정을 위한 혈액은 plain tube에 담아 4℃에서 원심분리후 혈장과 혈청을 -20℃에서 측정할 때까지 보관하였다. Sodium과 potassium은 채혈 즉시 혈청을 분리하여 flame photometry에 의해 측정하였다. Renin, aldosterone과 인슐린은 Diagnostic Product Corporation사의 방

사면역 측정 kit를 이용하여 방사면역측정법으로 측정하였다.

### 3) Glomerulosa세포의 분리

쥐의 부신 glomerulosa세포는 Braley등<sup>15)</sup>의 방법을 적용하여 분리하였다. 쥐를 희생시킨 후 부신을 적출하여 주위의 지방을 제거하고 피막을(capsule) 분리하여 미세분절로 절단한 후 0.1% bovine serum albumin (BSA), 10mM포도당을 함유한 modified Krebs Ring-er's Bicarbonate Glucose 용액(MKRBG : 117mM NaCl, 3.5mM KCl, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 24mM NaHCO<sub>3</sub>)에 3.7mg/ml Collagenase, 0.05mg/ml deoxyribonuclease를 첨가하여 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 하에서 1시간 배양하였다. 조직을 배양한후 3mm의 직경을 가진 pipette 으로 흡입하는 조작을 20~25회 반복하여 기계적인 힘으로 분산시켰다. 소화된 조직을 nylon망(pore 크기 50μm)에 통과시키고 실온에서 100g로 10분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 세포 덩어리를 0.1% BSA-MKRBG 용액으로 2회 세척하였다. 배양기로 37℃ 95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub>하에서 1시간 전배양 하면서 혈구계로 세포현탁액에서 세포수를 계산하고 세포의 생존성을 trypan blue염색을 하여 평가하였다. 이와 같은 세포 분리방법으로 1개의 부신에서 1×10<sup>5</sup>세포를 수거할 수 있으며 세포의 90%이상 생존함을 확인할 수 있었다.

### 4) Glomerulosa세포의 aldosterone분비기능의 측정

상기한 방법으로 분리한 glomerulosa세포를 0.1% BSA-MKRBG 용액으로 세포현탁액을 만들며 1×10<sup>5</sup>세포를 자극인자와 반응시켰다. 950μl의 세포현탁액과 50μl의 자극인자를 vial에 혼합하여 배양기에서 37℃, 60분 배양한 후 1500g로 10분간 원심분리하여 상층액을 -20℃에서 aldosterone 측정 시까지 보관하였다.

A II, ACTH(Bachem Finekemikalen, Switzerland)는 MKRBG 용액으로 희석하여 10<sup>-8</sup> M의 농도를 사용하고 K<sup>+</sup>는 8.7mM의 농도로 자극시켰으며 이러한 aldosterone분비물질의 농도는 Braley등에 의해 최대 자극농도로 보고된바 있다<sup>16)</sup>.

상층액의 aldosterone은 RIA kit(Diagnostic Product Corporation, U.S.A.)을 이용하여 방사면역 측정법으로 측정하였다.

## 5) Inositol phosphate의 측정

Inositol phosphate는 Woodcock등<sup>17)</sup>의 방법을 적용하여 측정하였다. Glomerulosa세포를 HEPES-buffered Ham's F12 media(20mM HEPES, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 3.7mM KCl)이 되도록 2회 세척하였다. 이렇게 정제된 glomerulosa세포에 0.1% BSA, 100U/ml의 penicillin과 streptomycin을 함유한 HEPES-buffered Ham's F12 media로 2-5×10<sup>6</sup> 세포/ml가 되도록 세포현탁액을 만들고 [<sup>3</sup>H]inositol (10μCi/ml: 1.2μM, New England Nuclear, Boston, MA)을 첨가하여 37°C로 18시간 배양하여 <sup>3</sup>H-inositol을 세포에 표지시켰다. 5mM의 비방사능 표지 inositol을 첨가하여 10분간 더 배양한 후 HEPES-buffered F12 media로 2회 세척하였다. 2-5×10<sup>6</sup>의 [<sup>3</sup>H] inositol 표지세포를 0.1% BSA, 5mM inositol, 10mM LiCl, 10<sup>-8</sup>의 A II를 첨가한 HEPES-buffered Ham's F12 media 0.3ml와 함께 plastic tube에 넣어 일정시간 배양(10초간격 6회, 1분 간격 4회 5분간격 4회)하였다. 1mM trichloroacetic acid를 가하여 반응을 중지시키고 0°C에서 10분간 세워 놓은 후 원심분리하였다. 상층액을 동일한 용적의 diethyl ether로 3회 추출하고, 1M KOH로 중화하여, 5ml의 증류수에 희석시켰다. 희석된 용액을 1ml AG-1 formate column(Bio-Rad, Richmond, CA)에 가하였다. 총 inositol phosphate를 1M ammonium formate-0.1M formic acid로 elution 하며, inositol mono, bis, triphosphate는 각각 12ml의 0.2M ammonium formate-0.1M formic acid, 0.4M ammonium formate-0.1M formic acid, 1M ammonium formate-0.1M formic acid로 elution 하였다. 이 elute를 증발시켜 건조하고 1ml의 증류수에 녹인 후 9ml의 scintillation fluid와 혼합하여 β-counter로 방사능을 측정하였다.

## 6) DAG, PA 및 PEt의 측정

Glomerulosa세포를 20mM HEPES, 1.25mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 3.7mM KCl이 되도록 조정된 HEPES buffered Ham's F12 media로 세척하였다. 이렇게 정제된 glomerulosa세포에 0.1% BSA, 100U/ml의 penicillin과 streptomycin을 함유한 HEPES-buffered Ham's F12 media로 2-5×10<sup>6</sup> 세포/ml가 되도록 세포현탁액을 만들고 [<sup>3</sup>H]arachidonic acid(100

μCi/mmol, New England Nuclear, Boston MA)을 첨가하여 37°C로 18시간 배양하여 <sup>3</sup>H-arachidonic acid를 세포에 표지시켰다. 18시간후 <sup>3</sup>H-arachidonic acid가 표지된 세포를 HEPES-buffered F12 배양액으로 2회 세척하였다. 2-5×10<sup>6</sup>의 [<sup>3</sup>H] arachidonic acid표지세포를 0.1% BSA(fatty acid free), 10<sup>-8</sup>M의 A II를 첨가한 HEPES-buffered Ham's F12 media 0.5ml(0.15% ethanol)와 함께 plastic tube에 넣어 10분간 배양하였다. 배양후 4°C로 차게한 chloroform-methanol(1:2 용적비) 3ml를 가하여 반응을 중지시키고 4°C에서 18시간 추출후 0.75ml의 500mM KCl/50mM EDTA를 첨가하고 vortex하여 1200rpm으로 원심분리후 organic phase(상층)는 제거하고, aqueous phase(하층)를 취하여 argon gas하에서 증발시킨후 50μl의 chloroform/methanol(2:1 용적비)에 용해시켜서 심하게 vortex하여 thin layer chromatography(TLC) plate(LK6D, Whatman, Clifton, NJ)에 가하고 isooctane/ethyl acetate/acetic acid/water(5/9/2/10;용적비)를 의 TLC 용매계를 적용하였으며 iodine vapor tank에서 지질들의 spot을 확인후 plate를 scrape하여 β-counter(Hewlet Packard, U.S.A.)로 방사능을 측정하였다<sup>18)</sup>.

## 8) 자료처리 및 분석

연구 결과는 통계 package인 SAS를 이용하여 분석하였다.

## 연구결과

### 1. 혈당, 전해질, renin및 aldosterone의 혈중농도

당뇨병 유발후 당뇨병군에서 심한 체중감소와 함께 공복혈당 294mg/dl의 심한 고혈당이 발생하였으며 혈중 인슐린 농도가 1.3μU/ml로 정상대조군의 15.4μU/ml에 비해 의미있게 저하되어 있었고(p<0.05) 인슐린으로 치료한 당뇨병군에서는 공복 혈당이 163mg/dl로 정상대조군에 비해 증가되어 있었으나 체중이 244±14.4g으로 대조군의 255±9.5g과 의미 있는 차이를 보이지 않았다(p>0.05). 혈장 renin활성도는 정상대조군이 2.3±0.9, 당뇨병군이 2.1±1.9, 인슐린으로 치료한 당뇨병군이 2.0±0.9ng/ml/hr, 혈장 aldosterone농도는 정상대조군이 483±294, 당뇨병군이 468±221, 인슐린으로 치료한 당뇨병군이 459±303pg/ml로 세군간에 의미

**Table 1.** Characteristics of rats

	Control (n=30)	DM (n=30)	Insulin treated DM(n=28)
Body weight (g)	255 ± 9	182 ± 6*	244 ± 14
Plasma glucose (mg/dl)	111 ± 7	294 ± 40*	163 ± 42
Plasma insulin (μU/ml)	15.4 ± 2.3	1.3 ± 0.9*	
PRA(ng/ml/hr)	2.3 ± 0.9	2.1 ± 1.9	2.0 ± 0.9
Plasma aldosterone (pg/ml)	483 ± 294	468 ± 221	459 ± 303
Plasma sodium (meq/L)	141 ± 4	133 ± 3	140 ± 2
Plasma potassium (meq/L)	3.8 ± 1.9	4.1 ± 1.2	4.1 ± 1.1

PRA : plasma renin activity Data are means SD. \*p<0.05 vs. control

**Table 2.** Response of aldosterone production to angiotensin II(10<sup>-8</sup>M), ACTH(10<sup>-8</sup>M) and K<sup>+</sup>(8.7mM) in glomerulosa cells from each group of rats

Stimulus	Aldosterone production(ng/10 <sup>5</sup> cells/hr)		
	Control	DM	Insulin treated DM
Basal	2.2±0.4	1.9±0.8	2.1±0.5
Angiotensin II (10 <sup>-8</sup> M)	11.0±3.4	4.4±2.1*	10.2±2.5
ACTH(10 <sup>-8</sup> M)	10.3±3.4	10.8±3.2	8.7±5.4
K <sup>+</sup> (8.7mM)	9.4±4.9	8.1±3.4	8.5±3.2

Data are means±SD of 4 experiments. \*p<0.05 vs. control

있는 차이가 없었고(p>0.05), 전해질농도도 세군간에 의미있는 차이가 없었다(Table 1).

## 2. Angiotensin II, ACTH, K<sup>+</sup>에 대한 glomerulosa세포의 aldosterone분비반응

당뇨병군의 부신glomerulosa세포의 기저상태, ACTH와 K<sup>+</sup> 자극 aldosterone분비는 각각 1.9±0.8, 10.8±3.2, 8.1±3.4ng/10<sup>5</sup>cells/hr로 정상대조군의 2.2±0.4, 10.3±3.4, 9.4±4.9ng/10<sup>5</sup>cells/hr와 의미 있는 차이가 없었던 반면(p>0.05) A II 자극 aldosterone의 분비는 4.4±2.1ng/10<sup>5</sup>cells/hr로 정상대조군의 11.0±3.4ng/10<sup>5</sup>cells/hr에 비해 의미있게 감소되어 있었으며(p<0.05) 인슐린으로 치료한 당뇨병군에서는 A II, ACTH, K<sup>+</sup> 자극 aldosterone의 분비가 10.2±2.5, 8.7±5.4, 8.5±3.2ng/10<sup>5</sup>cells/hr로 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(p>0.05)(Table 2).

## 3. Angiotensin II 자극에 대한 inositol phosphate의 생성

A II 자극에 의해 inositol phosphate중 inositol 1-monophosphate(IP<sub>1</sub>), inositol 1,4-bisphosphate(IP<sub>2</sub>), IP<sub>3</sub>는 A II 자극 10초이후부터 증가되기 시작하여 IP<sub>2</sub>와 IP<sub>3</sub>의 경우 30초까지 증가되고, IP<sub>1</sub>은 15분이후에도 상승되어 있어(Fig. 1) IP<sub>3</sub>측정을 위한 반응시간은

**Table 3.** Response of aldosterone production to phospholipase C(PLC), inositol 1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>), phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>), arachidonic acid(AA) and 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA) in glomerulosa cells from each group of rats

Stimulus	Aldosterone production(ng/10 <sup>5</sup> cells/hr)		
	Control	DM	Insulin treated DM
Basal	2.2±0.4	1.9±0.8	2.1±0.5
PLC(50mU/ml)	9.3±2.4	3.4±2.6*	8.7±3.4
IP <sub>3</sub> (10μM)	9.0±1.6	3.8±2.1*	8.7±4.4
PLA <sub>2</sub> (50mU/ml)	5.4±3.9	6.1±3.4	5.6±2.2
AA(10μM)	5.9±2.9	3.1±1.4*	5.5±2.2
TPA(2μM)	7.4±2.9	3.1±1.4*	6.6±3.2

Data are means±SD of 4 experiments.

\*p<0.05 vs. control

20초로 하였다. A II 자극후 IP<sub>3</sub>생성은 세군에서 모두 기저상태에 비해 의미 있게 증가하였으며(p<0.05), 당뇨병군 693±168, 정상대조군 641±114, 인슐린으로 치료한 당뇨병군 650±134 [3H] CPM/10<sup>6</sup> cells/20seconds 으로 세군간에 의미있는 차이가 없었다(p>0.05)(Fig. 2).

## 4. Angiotensin II 자극에 대한 phospholipase D활성

A II 자극에 의해 1분 배양후 PA, PEt와 DAG는 세군사이에 의미있는 차이가 없었다(p>0.05)(Fig. 3).

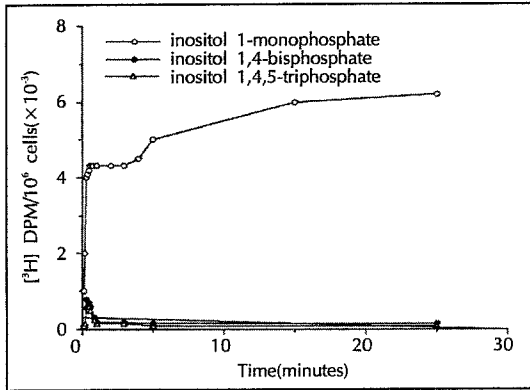


Fig. 1. Time course of inositol phosphate generation in the presence of angiotensin II in zona glomerulosa cells of rats.

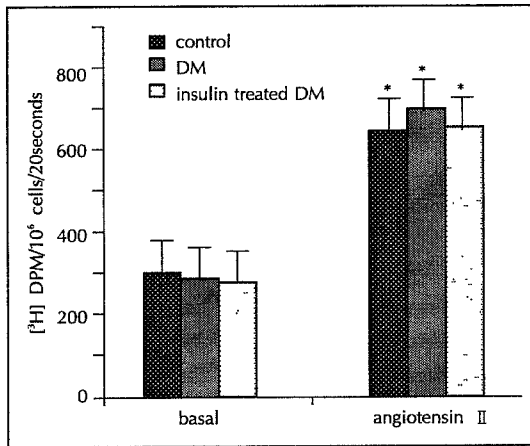


Fig. 2. Inositol triphosphate response to angiotensin II in glomerulosa cells from each group of rats. Data are means  $\pm$  SD from 4 experiments. \* $p < 0.05$  vs basal

## 고 찰

당뇨병성 저aldosterone혈증은 renin의 감소에 따른 2차적인 현상으로 생각되었으나<sup>3)</sup> 당뇨병에서 저aldosterone혈증을 보일때 혈중 renin농도는 정상이거나 상승되어 있어<sup>4)</sup> 부신 glomerulosa세포자체의 결함이 원인으로 대두되게 되었다<sup>23)</sup>. 저aldosterone혈증이 있는 당뇨병백서에서 부신 glomerulosa세포의 A II 수용체의 수와 친화도는 정상대조군 차이가 없어서 당뇨병성 저aldosterone 혈증의 기전이 되는 결함은 A II가 수용체 결합 이후의 수용체후 과정에 있다고 보고된 바 있어<sup>14)</sup> 당뇨병

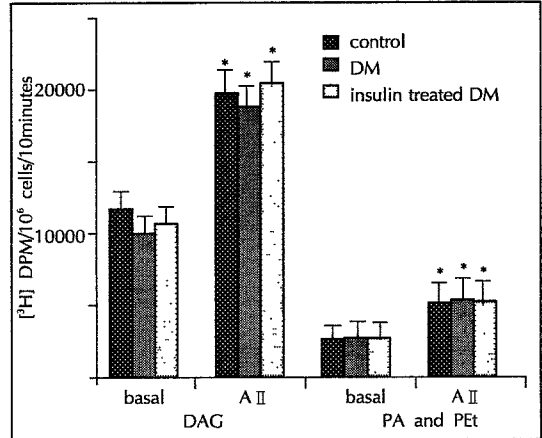


Fig. 3. Diacylglycerol(DAG), phosphatidic acid(PA) and phosphatidylethanol(PEt) response to angiotensin II in glomerulosa cells from each group of rats. Data are means  $\pm$  SD from 4 experiments. \* $p < 0.05$  vs basal

의 저aldosterone혈증, 즉 A II 자극 aldosterone 분비 반응의 결함은 A II 수용체 결합이후의 세포내 과정, 특히 A II의 신호전달계에 기전이 있을 것으로 추정된다.

본연구는 당뇨병을 유발시킨 백서에서 생체 및 시험관내 aldosterone분비의 변화 양상을 관찰하고 A II 자극 aldosterone 분비의 감소가 세포막 신호전달계의 이상에 의해 나타나는지 규명하고자 시행하였다. 본연구에서 당뇨병유발 백서는 혈장renin활성도와 aldosterone농도, 전해질농도가 정상 대조군과 유의한 차이가 없었으나 glomerulosa 세포의 시험관내 A II 자극 aldosterone의 분비는 유의하게 감소되어 있었으며 인슐린으로 치료한 당뇨병백서군에서는 A II 자극 aldosterone의 분비가 정상 대조군과 비슷하게 회복되었다. 본연구결과와 달리 과거 streptozotocin에 의한 당뇨병 유발백서는 당뇨병의 병 경과중 저renin성 저 aldosterone혈증이 흔히 관찰되어 왔으나<sup>6-10)14)</sup> 일부에서는 당뇨병유발 2달후에도 혈중 renin농도는 정상이라고 하여<sup>19)</sup> 당뇨병 유발백서의 혈중renin과 aldosterone농도는 다양한 양상을 보이며, 이는 고혈당의 정도나 당뇨병 유병기간이 다양하기 때문 일 것이다. 당뇨병백서에서 혈중 aldosterone농도는 감소되지 않았던 반면 시험관내에서 A II에 대한 aldosterone분비는 선택적으로 감소되어 있어 과거 Kigoshi등<sup>9)</sup> Azukizawa등<sup>14)</sup>의 결과와 동일하였고 ACTH와 K<sup>+</sup>에 대한 aldosterone의 분비는 정상이었으며 인슐린으로 치료한 경우 A II 자극 aldosterone의 분비결함이 회복되었

다. 인슐린은 부신 zona glomerulosa의 대사적인 환경의 조절 혹은 adrenotrophic, 성장 촉진의 작용을 통해 호르몬 생성에 영향을 줄수 있으며<sup>20)</sup>, 난소와 부신피질의 세포는 시험관내에서 인슐린의 첨가에 의해 호르몬의 생성이 증가되어<sup>21)22)</sup>, 인슐린이 glomerulosa세포의 aldosterone분비도 조절할수 있다고 추정되고 이러한 인슐린의 작용은 인슐린수용체가 부신 glomerulosa세포에서 증명됨에 따라 세포막의 수용체와 결합하여 나타날수 있을 것이다<sup>22-24)</sup>. 이외에도 단시간 인슐린의 주사에 의해 사람과<sup>25)</sup> 개<sup>26)</sup>에서 A II에 의한 aldosterone의 분비가 증가되는 것으로 보아 부신 glomerulosa세포의 aldosterone 분비에 인슐린이 요구되어 질 것으로 생각된다. 본연구에서도 인슐린으로 치료한 경우 당뇨병백서에서 관찰되는 A II 자극 aldosterone의 분비가 회복되는 것으로 보아 만성적인 인슐린의 결핍, 혹은 극심한 고혈당이 이러한 결과를 일으킨다고 생각되었으나 두가지 원인의 구별을 명확히 할수는 없었다. Renin감소에 의한 이차적인 A II의 만성적인 결핍도 A II 자극 aldosterone분비를 감소시킬수 있으며<sup>5)10)</sup>, renin에 의한 A II 생성뿐 아니라 부신에서 생성되는 A II도 aldosterone분비에 중요한 역할을 하므로<sup>27)</sup> 본 연구에서 혈중 renin이 정상이라고 하여 A II 결핍의 가능성을 배제할수는 없었다. 이와 같이 당뇨병 백서에서 A II 자극에 대한 감소된 aldosterone분비 반응의 기전은 확실하지 않다. 저aldosterone혈증이 있는 당뇨병백서의 부신 glomerulosa세포에서 A II 수용체의 수와 친화도는 정상대조군 차이가 없어서 당뇨병성 저aldosterone혈증의 기전이 되는 결합은 A II가 수용체 결합이후의 수용체 후 과정에 있을 것이라 하여<sup>14)</sup> A II 자극 aldosterone분비의 결합을 A II의 신호전달계에서 규명하고자 시도한 연구들이 있었다. Nadler등<sup>12)</sup>은 당뇨병 백서에서 부신 glomerulosa 세포의 basal과 ACTH, K<sup>+</sup> 자극 aldosterone 분비반응은 오히려 증가되고, A II 자극 aldosterone 분비반응은 감소되며, 시험관내에서 인슐린의 투여에 의해 A II 자극 aldosterone 분비가 회복되는 데 이때 A II의 신호전달계에 관여하는 arachidonic acid의 12-lipoxygenase 산물 12-HETE(hydroxy eicosatetraenoic acid)가 증가되므로 A II 자극 aldosterone분비의 결합기전이 lipoxygenase계의 결합에 있음을 보고하였고, 최근 Kim등<sup>13)</sup>은 당뇨병백서에서 A II와 K<sup>+</sup>에 대한 aldosterone의 시험관내 분비반응이

저하되어 있으나 인슐린치료에 의해 회복되며 A II 자극 IP<sub>3</sub>의 생성은 대조군과 차이가 없어서 A II 자극 aldosterone분비의 결합이 IP<sub>3</sub>생성이후에 있을 것이라고 하였다.

A II 자극후 aldosterone의 분비는 DAG 및 세포내칼슘증가에 protein kinase C(PKC)활성화가 주요단계이며 DAG는 PLC활성화에 의한 phosphatidylinositol (PI)분해나 PLD에 의한 phosphatidylcholine(PC)분해 후 PA의 대사에 의해 생성되고 PLC에 의해 생성된 IP<sub>3</sub>는 세포내칼슘을 유리시킨다. 저자는 A II 자극 aldosterone분비결합의 기전을 A II 자극후 PLC 및 PLD의 활성을 중심으로 규명하고자 하였다. 세포내 칼슘의 증가에 중요한 역할을 하는 IP<sub>3</sub>, PKC 활성화에 중요한 DAG는 A II 자극후 세균간에 의미있는 차이가 없었다. 이는 Kim등<sup>13)</sup>의 연구결과와 일치 하였고 이들이 추정한 바와 같이 IP<sub>3</sub>생성이후에 aldosterone의 분비 결합이 있거나 A II 작용의 다른 이차 전달물질의 생성 및 작용에 결합이 있을 것으로 생각하였다.

이상의 결과로 보아 당뇨병백서에서 부신 glomerulosa세포의 A II 자극 aldosterone 분비가 감소되며 이러한 A II 자극 aldosterone 분비 변화는 인슐린의 치료에 의해 교정되며 PLC와 PLD 활성화후 산물의 생성이 정상군과 차이가 없는 것으로보아 phospholipase의 활성화이후의 신호전달체계의 결합에 의한 것으로 생각되었다.

## 요 약

### 연구배경 :

당뇨병에서 흔히 고칼륨혈증과 대사성 산혈증을 초래하는 저aldosterone혈증의 원인은 확실치 밝혀져 있지 않으나 혈중의 renin농도와 ACTH, K<sup>+</sup> 자극에 대한 aldosterone의 분비는 다양하였으나 angiotensin II (A II) 자극에 대한 aldosterone의 분비는 공통적으로 감소되어 있다고 보고되었다. 그러나 이러한 A II 자극 aldosterone분비 감소의 기전은 확실치 밝혀져 있지 않다. 본연구는 당뇨병을 유발시킨 백서에서 생체와 시험관내 aldosterone분비의 변화양상을 관찰하고 A II 자극 aldosterone 분비의 감소가 세포막 신호전달계의 이상에 의해 나타나는지 밝히기 위해 A II 작용의 세포막 신호 전달계중 세포내칼슘증가와 PKC활성화에 중요한

PLC 및 PLD의 활성의 변화를 관찰하여 당뇨병에서 A II 자극 aldosterone 분비 변화의 기전을 A II의 신호 전달계중 인지질분해효소 활성화를 중심으로 밝히고 이러한 변화가 인슐린 치료에 의해 교정되는지 규명하고자 하였다.

#### 방 법 :

Sprague-Dawley 백서를 정상대조군, streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 군, 당뇨병 유발후 인슐린으로 혈당조절을 한 세군으로 분류하고 실험시작 2주후 희생시켜 혈중 renin과 aldosterone을 측정하였다. 부신 glomerulosa세포를 분리한 후 시험관내에서 ACTH와 K<sup>+</sup> 자극aldosterone 분비 반응의 변화 및 A II 자극 aldosterone 분비반응을 측정하였다. A II 자극후 PLC 및 PLD의 활성을 반영하는 IP<sub>3</sub>, PA, PEt, DAG를 측정하였다.

#### 결 과 :

1) 당뇨병백서의 혈장 renin활성도와 aldosterone 농도는 정상 대조군 및 인슐린으로 혈당을 조절한 군과 유의한 차이가 없었다(p<0.05).

2) 당뇨병백서의 부신 glomerulosa세포의 기저상태, K<sup>+</sup>, ACTH자극 aldosterone 분비는 정상대조군과 차이가 없었으나(p>0.05), A II자극 aldosterone의 분비는 유의하게 감소되어 있었으며(p<0.05) 인슐린으로 치료한 당뇨병백서군에서는 A II자극 aldosterone의 분비가 정상대조군과 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

3) A II 자극에 의한 IP<sub>3</sub>와 PA, PEt, DAG의 생성은 세군간에 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

#### 결 론 :

당뇨병백서에서 부신 glomerulosa세포의 A II 자극 aldosterone 분비가 감소되며 이러한 A II 자극 aldosterone 분비 변화는 인슐린의 치료에 의해 교정되고 PLC와 PLD 활성화후 산물의 생성이 정상군과 차이가 없는 것으로 보아 phospholipase의 활성화이후의 신호 전달체계의 결합에 의한 것으로 생각되었다.

### References

- 1) Perez GO, Lospier L, Jacobi J, Oster JR : Hyporeninemia and hypoaldosteronism in diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1977 ; 137 : 852
- 2) Morimoto S, Uchida K, Kigoshi T : Responsiveness

- of plasma aldosterone to angiotensin II in patients with diabetes mellitus. *Endocrinol Jpn* 1983 ; 30 : 671-678
- 3) Iwasaki R, Kigoshi T, Uchida K, Morimoto S : Plasma 18-hydroxycorticosterone and aldosterone responses to angiotensin II and corticotropin in diabetic patients with hyporeninemic and normoreninemic hypoaldosteronism. *Acta Endocrinol* 1982 ; 121 : 83-91
- 4) Braithwaite SS, Barbato AL, Emanuel MA : Acquired partial corticosterone methyl oxidase type II defect in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1990 ; 13 : 790-796
- 5) Kigoshi T, Morimoto S, Uchida K, Hosojima H, Yamamoto I, Imazumi N, Azukizawa S : Unresponsiveness of plasma mineralocorticoids to angiotensin II in diabetic patients with asymptomatic normoreninemic hypoaldosteronism. *J Lab Clin Med* 1985 ; 105 : 195-204
- 6) Hayashi M, Kitajima W, Saruta T : Aldosterone responses to angiotensin II, adrenocorticotropin, and potassium in chronic experimental diabetes mellitus in rats. *Endocrinology* 1984 ; 115 : 2205-2210
- 7) Rebuffat P, Malendowicz LK, Mazzocchi G, Giuseppe Gottardo G, Nussdorfer GG : Streptozotocin-induced experimental diabetes causes a time-dependent inhibition of growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Res Exp Med* 1990 ; 190 : 1-10
- 8) Pratt JH, Parkinson CA, Weinberger MH, Duckworth WC : Decreases in renin and aldosterone secretion in alloxan diabetes : An effect of insulin deficiency. *Endocrinology* 1984 ; 116 : 1712
- 9) Kigoshi T, Imazumi N, Azukizawa S, Yamamoto I, Uchida K, Kogishi F, Morimoto S : Effects of angiotensin II, adrenocorticotropin and potassium on aldosterone production in adrenal zona glomerulosa cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrinology* 1986 ; 118 : 183-191
- 10) Rebuffat P, Belloni AS, Ludwik K, Malendowicz LK, Mazzocchi G, Giuseppe Gottardo G, Nussdorfer GG : Zona glomerulosa morphology and function in streptozotocin induced diabetic rats. *Endocrinology* 1988 ; 123 : 949-957
- 11) Bergeron JJM, Rachubinsky R, Searl N, Borts D, Sikstrom R, Posner BI : Polypeptide hormone receptors in vivo. *J Histochem Cytochem* 1980 ; 28 :



- 12) Nadler J, Antonipillai I, Jost-Vu E, Natarajan R : *Altered regulation of angiotensin II - mediated aldosterone synthesis in diabetic rats : Role of insulin and IGF-I. 72nd Annual Meeting of Endocrine Society(Abstracts) 1990 ; 145*
- 13) Kim SY, Sung YA, Cho BY, Lee HK, Koh CS, Min HK : *Decreased angiotensin II -stimulated aldosterone production, but normal inositol phosphate response in adrenal glomerulosa cells from streptozotocin-induced diabetic rats : Role of inulin. Seoul J Med 1994 ; 35 : 73-82*
- 14) Azukizawa S, Kaneco M, Nakano S, Kigoshi T, Uchida K, Morimoto S : *Angiotensin II receptor and postreceptor events in adrenal glomerulosa cells from streptozotocin-induced diabetic rats with hypoadosteronism. Endocrinology 1991 ; 129 : 2729-2737*
- 15) Braley LM and William GH : *Rat adrenal cell sensitivity to angiotensin II, 1-24 ACTH and potassium : A comparative study. Am J Physiol 1977 ; 233 : E 402-E409*
- 16) Braley LM, Menacheray AI, Brown EM, Williams GJ : *Comparative effect of angiotensin II, potassium, adrenocorticotropin and cyclic adenosin 3'5'-monophosphate on cytosolic calcium in rat adrenal cells. Endocrinology 1986 ; 119 : 1010-1016*
- 17) Wookcock EA, Smith AI, White LBS : *Angiotensin II -stimulated phosphatidilinositol turnover in rat adrenal glomerulosa cells has a complex dependence on calcium. Endocrinology 1988 ; 122 : 1053-1061*
- 18) Kojima I, Kojima KJ, Rasmussen : *Possible role of phospholipase A<sub>2</sub> action and arachidonic acid metabolism in angiotensin II -mediated aldosterone secretion. Endocrinology 1985 ; 117 : 1057*
- 19) Wilkes BB : *Reduced glomerular angiotensin II receptor density in diabetes mellitus in the rat : time course and mechanism. Endocrinology 1987 ; 120 : 1291-1300*
- 20) Straus DS : *Effects of insulin on cellular growth and proliferation. Life Sci 1981 ; 29 : 2131-2138*
- 21) Veldhuis JD, Kolp LA, Toaff ME, Strauss JF, Demers LM : *Mechanisms subserving the tropic actions of insulin on ovarian cells. J Clin Invest 1983 ; 72 : 1046-1054*
- 22) Penhoat A, Chatelaind PG, Jaillard C, Saez JM : *Characterization of insulin-like growth factor I and insulin receptors on cultured bovine adrenal fasciculata cells ; Role of these peptides on adrenal cell function. Endocrinology 1988 ; 122 : 2518-2526*
- 23) Marques M, Bello AA, Machado VLA : *In vitro specific uptake of labeled insulin by liver, adipose tissue, pituitary and adrenals in the Turtle 'Chrysemys dorsigní'. Gen Comp Endocrinol 1982 ; 48 : 89*
- 24) Pillion DJ, Yang M, Grizzle WE : *Distribution of receptors for insulin and insulin-like growth factor I (somatomedin C) in the adrenal gland. Biochem Biophys Res Commun 1988 ; 154 : 138-147*
- 25) Viehapper H, Waldhasl W, Nowontny P : *The effect of insulin on the rise in blood pressure and plasma aldosterone after angiotensin II in normal man. Clin Sci 1983 ; 64 : 383-391*
- 26) Rocchi IAP, Moorehead C, DeRemer S, Goodfrient T, Ball DL : *Hyperinsulinemia and the aldosterone and pressor responses to angiotensin II. Hypertension 1990 ; 15 : 861-870*
- 27) Kifor I, Moore TZ, Fallo F, Sperling E, Chiou CY, Menachery A, Williams GH : *Potassium-stimulated angiotensin release from superfused adrenal capsules and enzymatically dispersed cells of the zona glomerulosa. Endocrinology 1991 ; 129 : 823-830*