

# 백서에서 방광 출구 단기부분폐색 초기의 방광 내 Nitric Oxide Synthase의 발현 변화

## Expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) in Rat Bladders Subjected to Short-term Partial Outlet Obstruction

Dong Hyun Ihm, Hyun Chul Chung, Jae Mann Song

From the Department of Urology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

**Purpose:** Nitric oxide synthase (NOS) is an important enzyme in the production of nitric oxide (NO). The constitutive type (cNOS) is expressed in the normal physiologic state, and the inducible type (iNOS) is expressed in the active immune state. cNOS is divided into an endothelial type (eNOS) and a neuronal type (nNOS). eNOS affects blood vessels, while nNOS affects nerve fibers. In the present study, we evaluated the expression of eNOS and nNOS in rat bladders with short-term partial outlet obstructions. We presupposed that NO is responsible for prolonged micturition problems after partial outlet obstruction.

**Materials and Methods:** Specific pathogen-free Sprague-Dawley rats weighing 250-300g were used for the study. Individual bladders were obtained from sham-operated control rats (n=5) and from experimental rats at 12 hours and 1, 2, 3, and 7 days after partial urethral obstruction (n=25). eNOS and nNOS were detected using immunochemical staining and analyzed with confocal microscopy and an image analyzer.

**Results:** eNOS and nNOS expression were detected in both the control group and in the group with partial outlet obstruction. The expression of eNOS showed a sharp increase at 3 days after obstruction and returned to normal at 7 days. The expression of nNOS was not significantly different between the two groups.

**Conclusions:** In this study, we showed that eNOS increases in the rat bladder after partial outlet obstruction. This finding suggests that overproduction of NO may be the result of ischemic injury sustained during partial bladder outlet obstruction. (Korean J Urol 2008;49:622-626)

**Key Words:** Short term partial bladder outlet obstruction, Endothelial nitric oxide synthase, Neuronal nitric oxide synthase

대한비뇨기과학회지  
제 49 권 제 7 호 2008

연세대학교 원주의과대학  
비뇨기과학교실

임동현 · 정현철 · 송재만

접수일자 : 2008년 3월 7일  
채택일자 : 2008년 5월 26일

교신저자: 송재만  
연세대학교 원주의과대학  
원주기독병원 비뇨기과  
강원도 원주시 일산동 162  
☎ 220-701  
TEL: 033-741-0651  
FAX: 033-741-1414  
E-mail: jmsong@yonsei.ac.kr

### 서 론

방광 출구의 부분 폐색에 의한 방광의 변화는 비뇨기과 의 영역에서 많은 관심과 연구가 이루어졌으며 폐색에 의한 과민성 방광의 원인에 대해서는 많은 논란이 있어 왔다. 방광 출구의 부분 폐색에 의한 과민성 방광을 설명하기 위한 가설은 크게 신경인성 원인 (neurogenic theory) 즉 배뇨근

의 탈신경화, 구심성 신경의 변화, 신경병적인 방광의 변화에 기인한다는 가설과 근성 원인 (myogenic theory) 배뇨근 자체의 변화에 기인한다는 두 가지의 가설로 나뉘며 근래에 들어서는 신경전달 단백질 (neurotransmitter protein)의 불균형에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1</sup>

Nitric oxide (NO)는 매우 불안정한 물질이며 L-arginine의 guanidironitrogen이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 변환되면서 생성되며 혈관계, 면역계, 신경계 등에서 다양한 역

할을 한다. NOS는 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 나뉘며 다시 cNOS는 혈관에 작용을 하는 endothelial NOS (eNOS)와 신경에서 주된 전달 물질로 생각되는 neuronal NOS (nNOS)로 나뉘게 된다.<sup>2</sup>

방광 및 요도조직에 있어 NOS에 대한 연구는 주로 평활근의 이완 특히 요도에 있어서 배뇨 시 요도 내압의 감소를 유발하는 것에 대해 많은 연구가 진행되어 있으며 음경의 발기에 관여하는 중요한 물질로 알려져 있다.<sup>3,4</sup> 그러나 방광 출구의 부분 폐색에 의한 초기 방광조직 내의 변화에 있어서 NOS의 발현 및 역할에 대해서는 아직 논란이 많다.<sup>5,6</sup> 이에 저자는 방광 출구의 단기 부분 폐색 후 백서에서 방광조직 내의 eNOS와 nNOS의 발현의 변화와 분포에 대해 알아보고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 대상

실험동물은 전문생산업체 (오리엔트, 가평, 한국)에서 생산된 specific pathogen free (SPF) Sprague-Dawley 성인 흰쥐 (주령 7, 체중 250-300g)를 사용하였다. 실험동물은 대조군 및 방광 출구의 부분 폐색군 (12시간, 1일, 2일, 3일, 7일)으로 나누었다 (n=5).

### 2. 실험 방법

대조군은 sodium thiopental (50mg/kg)을 복강 내로 투여하여 마취한 후 개복하여 결보기 수술을 시행하였으며 방광 출구의 부분 폐색군은 동일한 방법으로 마취를 시행한 후 하복부를 절개하여 백서의 요도와 방광을 노출시킨 후 주위를 조심스럽게 박리하였다. 요도를 박리한 후 요도주위에 외경이 1.0mm인 철사를 대고 4-0 black silk를 이용하여 결찰을 시행하였다. 이후 철사를 제거하고 방광을 눌러보아 외요도구의 요배출 및 수술 부위의 요누출 여부를 관찰하였다. 이때 요도주위의 요누출이나 외요도구로 요배출이 일어나지 않는 경우에는 실험에서 제외하였다.

### 3. 면역조직화학염색

대조군을 포함해서 백서는 수술 후 12시간, 24시간, 2일, 3일, 7일에 걸쳐서 방광을 적출하였다. 적출된 방광은 무게를 측정 후 4%의 paraformaldehyde (0.1M, pH 7.4)로 하루 동안 고정을 시키고 20% sucrose (0.05M, pH 7.4)로 48시간 동안 연속적으로 고정하였다. 생리식염수로 전 처리된 슬라이드에 5 µm 두께의 절편을 부착시킨 후 NOS의 면역조직화학 염색을 시행하였다.

조직절편을 탈 파라핀과 함수과정을 거친 후 구연산 완

충액 0.01M (pH 6.0)에 넣고 극초단파오븐에서 5분간 두 번 가열하여 항원성을 증가시켰다. 0.05M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에서 세척한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 내재된 peroxidase의 활성을 억제하고 PBS로 세척하였다. 5% goat 혈청 (RBI, USA)에 접촉하여 1시간 동안 37°C에서 적용하여 비특이적인 항원, 항체 결합을 억제하였다.

일차 항체는 anti nNOS mouse monoclonal IgG1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, USA)를 1:50으로 희석하였으며 anti eNOS rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, USA)도 1:50으로 희석하여 절편에 적용시킨 후 1시간 동안 37°C에서 적용하였다. 0.05M PBS로 세척을 한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 떨어뜨려 내재된 peroxidase의 활성을 억제하고 PBS로 세척하였다. PBS 용액에서 충분히 세척한 후 anti-mouse IgG FITC (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)와 Texas Red goat anti-rabbit antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)를 각각 상온에서 1시간 적용시켰다. 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)이 함유된 0.02M PBS로 30분 씩 2회 세척한 후 PBS로 1시간 세척하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 mounting media (Dako, Carpinteria, USA)를 이용하여 봉입하였다.

### 4. 영상 분석 및 통계처리

염색의 강도는 공초점현미경 및 영상분석기 (Zeiss LSM 5.0, Jena, Germany)를 이용하여 형광의 발현 정도를 평가하였다. 흰색을 0으로, 검은색을 255로 판정하여 염색정도 (intensity)를 gray scale에 따라 점수화하였다. 각 조직 당 적어도 5 field를 관찰하였고 각각의 조직 간의 염색강도는 비모수 검정 (Mann-Whitney법)을 이용하여 p값이 0.05 미만인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 통계분석에는 SPSS for Window (Version 10.0, SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하였다.

Table 1. Changes in bladder weights

	Bladder weights (mg)	
	Control	Partial bladder outlet obstruction
12 hours	112.4±4.8	115.6±3.6
1 day	117.7±5.5	118.2±4.3
2 days	116.4±4.8	134.6±2.6
3 days	115.3±4.6	158.7±11.4
7 days	115.7±3.2	477.2±23.6*

\*: p<0.05

## 결 과

대조군에서 방광 무게는 방광 폐색기간과 상관없이 큰 변화를 보이지 않았으나 단기 부분폐색 실험군에서는 의미 있게 방광 무게가 증가하여 폐색 7일에는 대조군에 비해

약 4배가 증가하였다 (Table 1).

실험군과 대조군에 있어서 eNOS와 nNOS의 발현이 관찰되었다. eNOS는 대조군에 비해 시간이 경과하면서 증가하여 방광 출구의 부분 폐색 후 3일째에 최고치를 나타냈고, 이는 대조군과 비교하여 통계학적으로 의미 있는 차이가 있었다. 이후 eNOS의 발현 수치는 감소하여 폐색 후 7일째

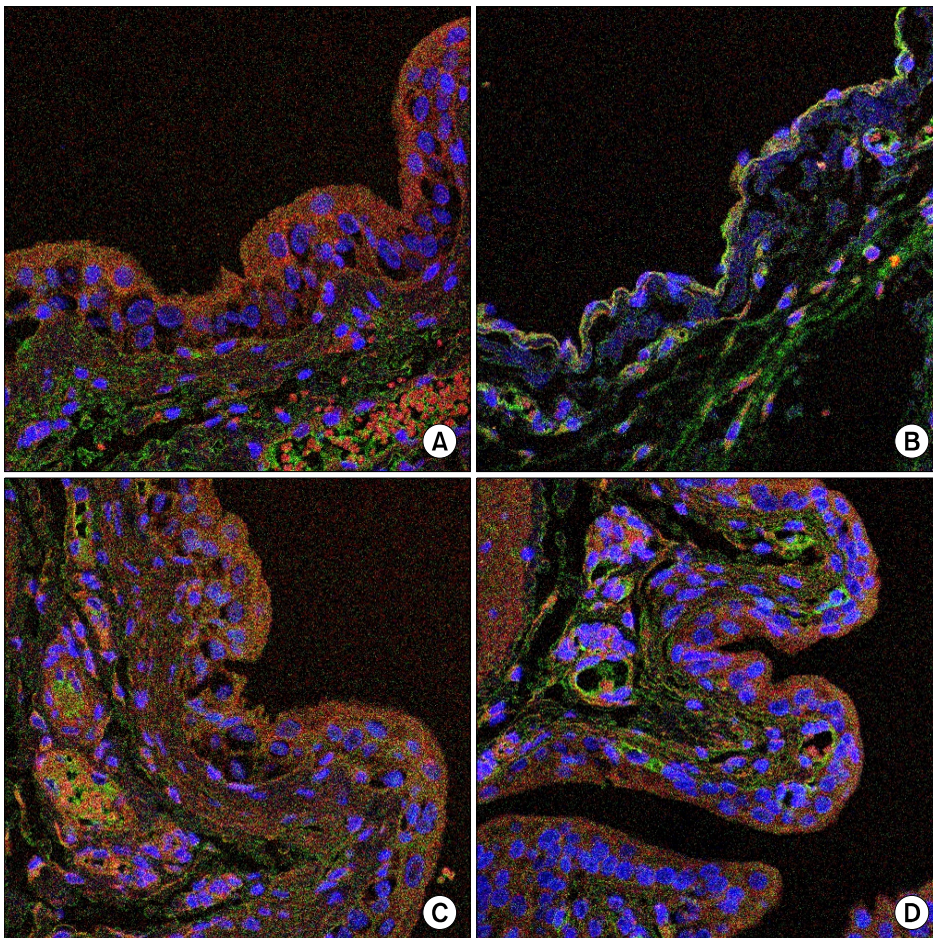
**Table 2.** Changes in endothelial nitric oxide synthase expression

	Gray scale of endothelial nitric oxide synthase	
	Control	Partial bladder outlet obstruction
12 hours	66.40±2.82	45.80±2.35
1 day	64.32±1.44	67.60±2.35
2 days	54.36±1.65	69.56±5.88
3 days	55.08±2.36	82.44±4.95*
7 days	55.87±2.07	65.67±5.46

\*:  $p < 0.05$

**Table 3.** Changes in neuronal nitric oxide synthase expression

	Gray scale of neuronal nitric oxide synthase	
	Control	Partial bladder outlet obstruction
12 hours	37.45±1.21	35.10±0.91
1 day	35.09±1.84	37.60±1.96
2 days	35.56±2.25	45.38±3.45
3 days	36.40±1.24	43.30±2.45
7 days	37.32±2.31	43.90±1.07



**Fig. 1.** Expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (red, Texas Red goat anti-rabbit antibody, 1:200) and neuronal NOS (nNOS) (green, anti-mouse IgG FITC, 1:200) (x400). (A) Control, (B) 12 hours after partial bladder outlet obstruction, (C) 3 days after partial bladder outlet obstruction, (D) 7 days after partial bladder outlet obstruction.

는 대조군과 차이를 나타내지 않았다 (Table 2). nNOS는 시간이 경과하면서 지속적인 증가소견을 보였지만 대조군과 비교하여 통계학적인 의의는 관찰할 수 없었다 (Table 3).

eNOS 및 nNOS의 방광조직 내의 발현은 주로 방광조직의 점막층과 근육층 사이에서 관찰되었으며 eNOS는 혈관주위에 침착소견을 보였다 (Fig. 1).

## 고 찰

NO는 endothelial derive relaxation factor의 일종으로 1980년 Furchgott와 Zawadzki<sup>7</sup>에 의해 처음 밝혀졌다. 생체 내에서 세 가지 유형으로 존재하는 것으로 알려져 있으며 반감기가 20분 정도로 매우 짧은 물질로 L-arginine의 guanidiro-nitrogen이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 변환되면서 생성된다. 유형 I (nNOS)는 주로 뇌, 척수, 말초 신경계 등에 존재하며 신경세포의 nonadrenergic noncholinergic (NANC) 신경계의 신경전달 물질로 평활근의 이완 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 유형 III (eNOS)는 혈관의 내피세포에 주로 존재하며 혈관의 평활근의 이완, 혈관의 확장, 혈소판과 백혈구의 응집을 억제하는 것으로 알려져 있다. 유형 II (iNOS)는 활성화된 대식세포 등에서 분비가 되며 염증 반응이나 스트레스 상황에서 분비가 촉진되는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 각각의 NOS를 지정하는 염색체는 eNOS는 염색체 7번에 지정되어 있으며 nNOS는 염색체 12번에, iNOS는 염색체 17번에 지정되어 있다.<sup>9</sup> eNOS는 세포막과 연관되어 작용을 하며 nNOS와 iNOS는 세포 내에서 작용을 한다.

NO의 역할에 대해 음경의 발기나 근위요도에서의 역할에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나 방광에서의 역할에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 바가 없다. Huang 등<sup>10</sup>의 보고에 의하면 정상 방광에서 국소적인 혈관의 톤을 유지하거나 근육의 이완, 상피의 성장 조절, 세포 외 단백질 (extracellular matrix protein)의 합성 분비 조절에 관여하는 것으로 생각한다. 위 (stomach)의 경우 NO는 뮤신 (mucin)의 분비를 자극함으로써 위 점막 세포를 보호하는 것으로 보고되고 있으며 이와 비슷한 기전으로 방광의 이행상피에서 당단백 (glycoprotein)을 분비함으로써 요에 의한 세포의 손상을 억제하는 것으로 생각한다.<sup>11,12</sup> 또한 동물실험 모델에서 만성적인 신 폐색군에서 iNOS의 증가와 함께 eNOS, nNOS의 증가를 볼 수 있는데 이로 인해 근육층의 혈관 확장과 함께 섬유화의 억제 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있으며 방광에 있어서는 방광 기저층의 신경을 자극하여 cGMP의 합성을 증가하여 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>13</sup>

방광 출구의 부분 폐색으로 인한 방광의 불안정성과 보

상의 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 동물실험모델에 의하면 방광의 허혈성손상을 한 원인으로 생각한다.<sup>14</sup> 즉 쥐에서 NO의 전구물질인 L-arginine을 투여하면 방광의 혈류의 증가와 함께 방광의 불안정성의 개선을 보이며 iNOS의 억제제를 투여하면 방광의 크기의 증가와 함께 불수의적인 방광의 수축을 억제할 수 있는 것으로 보고하고 있다. 방광에서 nNOS의 경우 방광의 구성성 섬유에서 증가를 관찰할 수 있는데 방광폐색의 경우 폐색 후 nNOS의 감소가 관찰되었다.<sup>15</sup> 본 연구에서도 eNOS의 증가는 뚜렷이 관찰되었지만 방광 점막하층의 nNOS의 증가는 대조군과 비교하여 변화가 없었으며 부분 폐색 후 3일째 eNOS의 증가가 정점을 이루고 이후 감소되는 소견을 보였다. 이는 방광 폐색의 초기에 있어서 혈류의 감소에 의한 허혈성 손상으로 인해 eNOS의 증가가 나타나고 이후 방광의 보상 기전이 나타나면서 허혈성 손상이 안정화를 이루는 것으로 생각되며 초기의 반응에는 nNOS 등의 신경학적인 반응은 미비한 것으로 생각한다.

방광 조직에 있어서 NOS의 분포를 보면 차이를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 토끼를 이용한 실험군의 경우 방광의 점막층에서 NOS의 활성이 뚜렷하며<sup>16</sup> 사람의 경우에는 방광의 근육층에서 eNOS의 발현이 증가하고 nNOS는 점막하층과 근육층 사이의 신경에서만 발현하는 것을 볼 수 있었다.<sup>17</sup> 본 실험에 있어서 NOS의 발현 부위는 근육층 염색을 시행하지 않아 정확한 구분을 할 수 없지만 주로 점막층과 근육층 사이에서 eNOS와 nNOS의 발현의 증가를 관찰할 수 있었다.

최근 보고에 의하면 방광에서 eNOS 및 nNOS의 증가는 세포고사와의 연관성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 즉 eNOS의 증가로 방광의 혈류의 증가가 일어나고 nNOS의 증가는 cGMP의 증가를 발생시켜 세포의 고사를 일으키고 이러한 요인으로 인해 방광 이행상피의 과증식을 억제하는 기전이 발생하고 이러한 과증식의 억제로 인해 폐쇄성자극에 의한 방광의 유지기능을 설명하고 있다.<sup>18</sup> 본 연구는 방광 부분 폐색에 대한 방광의 초기 변화에 대한 연구로 이후 장기간의 폐색을 유발시킨 흰쥐에서 방광의 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각한다.

요도의 폐색으로 인한 과민성 방광에는 기존의 신경전달 물질인 아세틸콜린 등에 관한 연구는 활발히 진행되어왔지만 NO에 대한 연구는 아직 많은 부분에 있어서 미흡한 점이 많다. 특히 방광폐색에 있어서 만성적인 폐색의 연구에 중심이 있고 초기의 방광에서의 NO의 변화에 대해서는 아직 연구가 미미한 실정이다. 이후 이 연구를 중심으로 보다 많은 연구가 진행되면 방광에 있어서 NO의 역할에 대해 보다 명확한 규명이 될 것으로 생각한다.

## 결론

흰쥐에서 방광 출구의 단기 부분 폐색으로 인해서 방광 조직 내의 NOS의 양이 변화하며 특히 eNOS의 증가가 폐색 초기의 방광조직 내에서 관찰된다. 이는 허혈성 손상으로 인한 eNOS 발현의 증가로 생각된다. 그러나 방광 출구의 부분 폐색으로 인해서 방광 내의 nNOS는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이후 장기간의 방광 출구의 부분 폐색이 유발된 방광조직내에서 NOS의 변화에 대해 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Abrams P. Describing bladder storage function: overactive bladder syndrome and detrusor overactivity. *Urology* 2003;62 (5 Suppl 2):28-37
- Ho MH, Bhatia NN, Khorram O. Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:423-9
- Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol* 1995;153:2004-9
- Hallen K, Gustafsson LE, Wiklund NP. Nerve-induced release of nitric oxide from the rabbit corpus cavernosum is modulated by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Neuroscience* 2005; 133:169-74
- Lemack GE, Burkhard F, Zimmern PE, McConnell JD, Lin VK. Physiologic sequelae of partial infravesical obstruction in the mouse: role of inducible nitric oxide synthase. *J Urol* 1999; 161:1015-22
- Persson K, Poljakovic M, Johansson K, Larsson B. Morphological and biochemical investigation of nitric oxide synthase and related enzymes in the rat and pig urothelium. *J Histochem Cytochem* 1999;47:739-50
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6
- Forstermann U, Pollock JS, Tracey WR, Nakane M. Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Methods Enzymol* 1994;233:258-64
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-31
- Huang A, Palmer LS, Hom D, Valderrama E, Trachtman H. The role of nitric oxide in obstructive nephropathy. *J Urol* 2000;163:1276-81
- Whittle BJ. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J* 1995;27:727-37
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43: 109-42
- Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, de Vente J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience* 1996;71:337-48
- Saito M, Miyagawa I. N (G)-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn* 2002;21:566-71
- Theobald RJ Jr. Differing effects of N (G)-monomethyl L-arginine and 7-nitroindazole on detrusor activity. *Neurourol Urodyn* 2003;22:62-9
- Masuda H, Okuno T, Suzuki M, Kihara K, Goto M, Azuma H. Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. *J Urol* 2002;168:2286-90
- Fathian-Sabet B, Bloch W, Klotz T, Niggemann S, Jacobs G, Addicks K, et al. Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J Urol* 2001;165: 1724-9
- Nitsch DD, Ghilardi N, Mühl H, Nitsch C, Brune B, Pfeilschifter J. Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cells. *Am J Pathol* 1997;150:889-900