

## 고염식이가 흰 생쥐의 부신 수질에 미치는 효과

문영화\*, 강화선

가톨릭대학교 의과대학 자연과학교실 세포의학·생물학과

### Effects of High-salt Diet on the Mouse Adrenal Medulla

Young Wha Moon\* and Wha Sun Kang

Department of Cell Medicine & Biology, College of Medicine Catholic University,  
505 Banpo-dong, Socho-gu, Seoul 137-701, Korea

(Received November 28, 2003; Accepted December 11, 2003)

#### ABSTRACT

Exposure to stressful stimuli is known to activate the peripheral sympathetic nervous system and the adrenal gland. In this study, we evaluated the effects of high salt diet on the mouse adrenal medulla using the tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry and the transmission electron microscopic observation.

Immunoreactivity for TH was increased after high salt diet. Especially, the TH immunoreactivity was stronger in 4 days high salt diet mouse than that of 4 weeks. TH immunoreactivity was mainly present in the cytoplasm and granules of the noradrenaline cells. After high salt diet, the noradrenaline cells exhibited the ultrastructural alterations consisting of areas of empty cytoplasm, expanded granules, and some damaged mitochondria.

These results suggest that high salt diet may be a factor of stressful stimuli on the mouse.

**Key words :** Adrenal medulla, High salt diet, Noradrenaline cell, Stress, Tyrosine hydroxylase

#### 서 론

스트레스는 교감신경계의 절후신경 말단에서 노르에피네프린의 방출을 증가시키며 부신수질에서 에피네프린의 분비를 증가시킨다. 스트레스동안 교감신경과 부신수질 크롬친화성 세포에서 카테콜라민 생합성이 증가하였다(Kvetnansky et al., 1992a). 이러한 카테콜라민 생합성의 증가는 카테콜라민성 세포 내 Tyrosine

hydroxylase (TH) 활성의 증가에 의한 것이다(Zigmond et al., 1989; Kumer & Vrana, 1996).

TH는 말초신경계와 중추신경계에서 카테콜라민 합성에 관여하는 효소로 알려졌다(Weiner, 1975). 스트레스에 의한 TH의 활성은 급성 혹은 지속성에 따라 차이를 나타낸다. 순간적인 자극에 의한 급성 스트레스의 경우에는 이미 카테콜라민성 조직들에 존재하던 TH가 multiple protein kinase에 의하여 활성이 유도되지만, 지속적으로 스트레스를 받은 동물에서는 TH의

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young Wha Moon, Department of Cell Medicine & Biology, College of Medicine & Nursing, Catholic University, 505 Banpo-dong, Socho-gu, Seoul 137-701, Korea. Ph: (02) 590-1277, FAX: (02) 535-4526, E-mail: ywmoon@catholic.ac.kr  
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

생합성이 증가된다고 보고되었다 (Osterhout et al., 1997). 특히 찬 환경에 노출시키거나 (Zigmond et al., 1974; Chuang et al., 1975), 움직임을 제한하거나 (Kvetnansky et al., 1970; Palkovits et al., 1975), 소음에 노출시키거나 (Pellegrini et al., 1997; Gesi et al., 2002), 혹은 특정 약물을 적용하는 [예; carbachol (Guidotti & Costa, 1973), reserpin (Joh et al., 1973)] 등의 스트레스를 지속적으로 가하면, 스트레스를 받은 동물들의 카텔콜라민성 조직들에서 TH 활성이 증가한다고 보고되었다.

염분제한식이나 고염식이와 혈액의 양 혹은 고혈압에 영향을 미치는 호르몬 중에 하나인 부신피질 알도스테론 생합성과의 관련성에 대한 많은 연구가 있으나 (LeHoux et al., 1974; Kramer et al., 1979; Muller, 1980; Tremblay & LeHoux, 1993), 고염식이 부신피질의 크롬친화성 세포에 미치는 영향에 대해서는 아직 알려지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 고염식이 흰 생쥐의 부신피질에 위치한 크롬친화성 세포에 미치는 영향을 규명하기 위하여 면역조직화학법과 투과 전자현미경 관찰을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR계 흰 생쥐 (6주령) 수컷으로 무균 동물실험실 (습도; 50~55%, 온도; 23~24°C, 빛; 명암 12시간씩)에서 1주일 동안 일반식수 (염분농도; 0%)와 고형사료 (염분농도; 0.63%)를 주면서 적응시켰다. 동물실 적응 1주일 후 정상군은 적응기간과 동일한 조건으로, 실험군 (고염식이군)은 식수로 3% NaCl 용액을 공급하였다. 고염식은 4일과 4주 동안 지속적으로 시행하였으며 각 실험군 당 적어도 6마리 이상의 동물을 사용하였다.

### 2. 실험방법

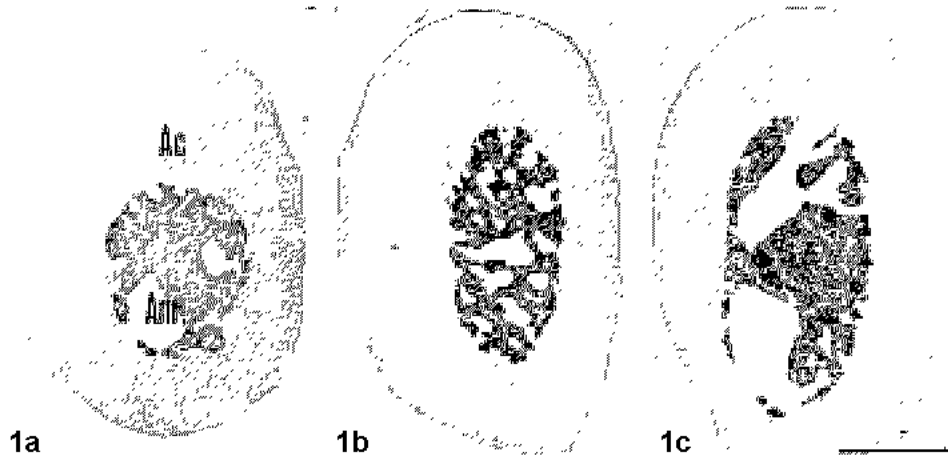
TH 면역반응세포를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 동물들을 16.5% urethane (1 ml/100 g 체중)으로 마취하고, 심장을 통하여 전관류액 (0.9% NaCl, 1% NaNO<sub>2</sub>, 0.2% heparin)으로 혈액을 씻어낸 뒤 4% para-

formaldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)액으로 관류 고정하였다. 절취한 부신은 동일 고정액에 3시간 동안 재고정하고 0.1 M phosphate buffer로 세척하였으며 각급 ethanol로 탈수하고 wax (polyethylene glycol 400 diesterate, Polyscience, Warrington, PA, USA)에 포매한 후 6 µm 두께의 연속횡단 절편을 작성하였다.

이들 조직 절편들은 wax를 제거한 후 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)법 (Hsu et al., 1981)으로 면역염색을 시행하였다. 면역염색은 먼저 조직 내 비특이 면역반응을 제거하기 위하여 정상혈청 (3% normal horse serum)을 적용시킨 후 시행하였으며, 사용한 1차 항체는 monoclonal mouse anti-TH antibody (Zymed Lab. Inc. CA, USA)로 1:15000으로 희석하여 사용하였다. 2차 항체로는 biotin이 표지된 anti-mouse Ig G (희석비율 1:50, Vector Lab, CA, USA)를 그리고 3차 항체로는 avidin-biotin-peroxidase complex (희석비율 1:100, Vector Lab, CA, USA)를 사용하였으며, 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride-0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합액으로 정색하였다.

전자현미경으로 부신 수질 내 TH 면역반응세포를 관찰하기 위하여 포매 전 염색법 (preembedding method)을 이용하였다. 일차 고정 (4% paraformaldehyde)된 조직을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 씻은 후 vibratome (Reichert-Jung, Germany)으로 50 µm 두께의 횡단절편을 작성하였다. 이들 절편을 위에서와 동일한 방법으로 면역 염색하였다. 면역 염색된 절편을 세척액으로 씻은 후 1% glutaraldehyde에 30분간, 2% osmium tetroxide에 2시간 재 고정하였으며 이를 1% uranyl acetate로 염색한 후 탈수하고 Epon 812 혼합액에 포매하였다. LKB Ultratome (Reichert-Jung, Germany)으로 초 박질 표본을 만들어 투과전자현미경 (JEM 1010)으로 관찰하였다.

일반 전자현미경 관찰을 위하여는 위에서와 같은 방법으로 마취한 실험동물에서 부신을 채취한 후 pH 7.2에서 0.1 M phosphate buffer로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde-paraformaldehyde액에서 3시간, 2% osmium tetroxide액에서 1시간 동안 고정된 후 각급 ethanol과 acetone으로 탈수하였으며, Epon 812 혼합액에 포매하여 60°C Polymerizer (Reichert-Jung, Germany)에서 72시간 동안 중합시켰다. 포매된 조직은 1



**Fig. 1.** Photomicrographs of adrenal gland from the normal (a) and the high-salt diet mice for 4 days (b) and 4 weeks (c) of the mice, showing TH immunoreactivities. TH immunoreactivities are observed in the adrenal medulla. Reaction intensities are stronger in the high-salt diet mice as compared to the normal mice. The adrenal medulla from 4 days high-salt diet mice shows the strongest TH immunoreactivity. Ac; adrenal cortex, Am; adrenal medulla, Scale bar = 50  $\mu$ m

$\mu$ m의 박절편을 만들어 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경에서 관찰할 부위를 확인하고, LKB Ultratome (Reichert-Jung, Germany)으로 초박절 표본을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하였으며 JEM 1010형 전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

일정기간 동안 일반 식수로 사육한 정상군과 3% NaCl 용액만을 식수로 섭취하게 한 고염식이군의 부신을 TH 항체로 면역염색을 시행한 결과, 정상군과 고염식이군의 부신 수질 세포가 TH 면역반응을 나타내었다. 정상군보다 고염식이군에서 더 강한 면역반응을 나타냈으며, 장기간(4주) 고염식을 시행한 경우에서 보다는 단기간(4일)의 고염식이군에서 더 강한 TH 면역반응을 보였다(Fig. 1a, b, c). 또한 단기간의 고염식이군의 부신 수질 내 TH 면역반응은 고르게 나타났으나(Fig. 1b), 4주간 고염식이군의 부신 수질 내 크롬친화성 세포들 중 몇몇 세포 군들에서는 TH 면역반응이 더 강하게 관찰되었다(Fig. 1c).

TH에 면역반응을 보이는 세포를 전자현미경을 이

용하여 관찰하였다. 부신 수질 내 크롬친화성 세포들은 아드레날린을 분비하는 세포(아드레날린 세포)들과 노르아드레날린을 분비하는 세포(노르아드레날린 세포)들로 구성되는데, 이들 세포들 중 노르아드레날린 세포의 세포질과 분비 과립들에서 TH 면역반응이 나타났다(Fig. 2).

투과 전자현미경 관찰 결과, 흰 생쥐 부신 수질의 크롬친화성 세포들은 주로 다각형이었으며, 핵은 구형으로 핵 주변부에 소량의 이질 염색질이 관찰되었고, 다수의 미토콘드리아가 세포질 내에 산재되어 분포하였다(Fig. 3a). 노르아드레날린 세포는 아드레날린 세포에 비하여 세포질의 전자밀도가 더 진하고 분비 과립의 크기가 큰 것으로 관찰되었다(Figs. 3a, 4a). 노르아드레날린 세포의 세포질에는 많은 수의 분비 과립들이 조밀하게 분포된 반면 아드레날린 세포의 세포질에는 분비 과립들 사이에 미토콘드리아, 과립성 내형질세망 등의 세포소기관들이 산재해 있었다(Fig. 4a).

4일 동안 고염식을 시행한 흰 생쥐 부신 수질에서 아드레날린 세포의 미세구조는 정상군과 비교하여 큰 변화를 관찰할 수 없었으나(Fig. 3b), 노르아드레날린 세포의 세포질에는 빈공간들이 생겨났으며 분비과



**Fig. 2.** Electron micrograph of the adrenal medulla from 4 weeks high-salt diet mouse, showing TH immunoreactivity. TH immunoreactivities are mainly present in the cytoplasm and granules (arrowheads) of the noradrenaline cell (NA). A; adrenaline cell, m; mitochondria, V; blood vessel, Scale bar = 0.1  $\mu$ m

립 내 분비물질들이 과립의 한 구석으로 밀려있는 형태들이 다수 관찰 되었다(Fig. 4b, d). 또한 미토콘드리아의 크리스타 구조가 일부 파괴되고 다른 막 구조들과 연합하여 나타났다(Fig. 4d). 4주간 고염식을 시행한 흰 생쥐의 부신 수질에서도 아드레날린 세포의 형태적 변화는 관찰할 수 없었으며(Fig. 3c), 노르아드레날린 세포들은 정상군에 비하여 세포질의 전자밀도가 진하게 나타났다(Fig. 3c, d). 또한 노르아드레날린 세포들에서 분비과립의 막 구조가 불규칙하고 분비물질은 한 쪽으로 치우쳐 있거나, 무형의 기질들이 내재하지만 전자밀도가 아주 약하여 거의 비어 있는 형태의 팽창된 분비 과립들과, 손상된 형태의 미토콘드리아들이 관찰되었다(Fig. 4c).

## 고 찰

일정한 기간동안 3% NaCl 용액을 식수로 제공하는

방법으로 고염식을 시행한 생쥐의 부신 수질에서, 크롬친화성 세포들이 TH 면역반응 및 미세구조에서 정상군과 비교하여 변화를 나타내었다. 정상군과 고염식이군 모두의 부신 수질 크롬친화성 세포들에서 TH에 대한 면역반응이 나타났으나, 정상군에 비해 고염식이군에서 TH 면역반응이 증가하였다.

스트레스성 자극은 뇌의 특정 부위에서 카테콜라민의 방출을 증가시키고(Borell et al., 1980), 시상하부와 뇌하수체 그리고 부신을 축으로 하여 교감신경계를 활성화 시킨다(Axelrod & Reinsine, 1984). 결과적으로 대부분의 스트레스성 조건은 교감신경의 신경절과 부신수질로부터 노르아드레날린과 아드레날린을 분비하게 한다(Kvetnansky et al., 1992b).

급성 스트레스시에는 카테콜라민 분비가 증가되고, 부신수질과 교감신경계의 신경절에서 카테콜라민 생합성시 작용하는 효소인 TH가 multiple protein kinase에 의하여 활성화 되며(Zigmond et al., 1989), 또한 지속성 스트레스는 TH mRNA의 합성을 유도하여 TH의 양을 증가시킨다(Kvetnansky et al., 1970; Stachwiak et al., 1985; Tank et al., 1985)고 보고되었다. Osterhout et al. (1997)은 3일 동안 4°C의 냉방에서 사육한(cold stress) 생쥐의 부신수질에서, TH의 양과 효소활성이 증가하였으며 이는 이러한 스트레스성 환경이 TH 유전자의 발현에 영향을 미친 결과라고 보고하였다. 이는 본 연구 결과 고염식을 시행한 흰 생쥐의 부신 수질에서 TH 면역반응이 증가한 결과와 일치한다.

Gesi et al. (2002)은 6시간동안 시끄러운 소리(100 dBA)에 노출시킨(noise stress) 흰 쥐의 부신 수질내 카테콜라민성 세포들에서 노르아드레날린세포 내 분비 과립들의 수가 증가하였다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 4일과 4주동안 고염식을 시행한 노르아드레날린 세포내 분비과립은 정상군에 비하여 더 조밀하였으며, 분비과립의 크기도 증가하였고, 커다란 비어 있는 과립들도 다수 관찰되었다. 또한 Pellegrini et al. (1997)과 Gesi et al. (2002)은 100 dBA의 소음에 6시간 동안 노출시킨 흰 쥐의 부신 수질내 노르아드레날린 세포들에서 세포질 내 빈 공간들과 손상된 미토콘드리아 등을 관찰하였다. 본 연구결과 4일간 고염식을 시행한 흰 생쥐의 노르아드레날린 세포에서 세포질 내 빈 공간들이 빈번하게 관찰되었으며, 손상된

미토콘드리아는 4일과 4주의 고염식이군 모두에서 관찰되었다. 이와 같이 본 연구의 고염식이를 시행한 생쥐 부신수질의 노르아드레날린 세포의 미세구조는 소음 스트레스에 따른 결과(Pellegrini et al., 1997; Gesi et al., 2002)들과 일치한다.

소음이나 cold stress 등 각종 스트레스들에 노출된 동물들에서 보고된 생화학적 및 형태학적 특징들이 본 연구에서 사용한 3% NaCl 용액을 식수로 공급한 고염식이군의 흰 생쥐에서 나타난 결과들과 일치하였다. 이는 고염식이가 일종의 스트레스를 유발하는 원인일 것임을 시사하나, 고염식은 섭취된 Na<sup>+</sup>가 생체에 미칠 수 있는 여러가지 영향(즉, 혈압이나 혈액양)들과 관련되어 있을 수 있으므로 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Axelrod J, Reisine TD: Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224 : 452-459, 1984.
- Borrell J, Torrellas A, Guaza C, Borrell S: Sound stimulation and its effects on the pituitary-adrenocortical function and brain catecholamines in rats. *Neuroendocrinology* 31 : 53-59, 1980.
- Chuang D, Zsilla G, Costa E: Turnover rate of tyrosine hydroxylase during trans-synaptic induction. *Mol Pharmacol* 11 : 784-794, 1975.
- Gesi M, Lenzi P, Alessandri MG, Ferrucci M, Fornai F, Paparelli A: Brief and repeated noise exposure produces different morphological and biochemical effects in noradrenaline and adrenaline cells of adrenal medulla. *J Anat* 200 : 159-168, 2002.
- Guidotti A, Costa E: Involvement of adenosine 3', 5' monophosphate in the activation of tyrosine hydroxylase elicited by drugs. *Science* 179 : 902-904, 1973.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580, 1981.
- Joh TH, Gephman C, Reis D: Immunohistochemical demonstration of increased accumulation of tyrosine hydroxylase protein in sympathetic ganglia and adrenal medulla elicited by reserpine. *Proc Natl Acad Sci* 70 : 2767-2771, 1973.
- Kramer RE, Gallant S, Brownie AC: The role of cytochrome P-450 in the action of sodium depletion on aldosterone biosynthesis in rats. *J Biol Chem* 254 : 3953-3958, 1979.
- Kumer SC, Vrana KE: Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67 : 443-462, 1996.
- Kvetnansky R, Armando I, Weise VL, Holmes C, Fukuhara K, Deka-Starosta A, Kopin IJ, Goldstein DS: Plasma DOPA responses during stress: dependence on sympathetic activity and tyrosine hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 261 : 899-909, 1992a.
- Kvetnansky R, Goldstein DS, Weise VK, Holmes C, Szemerdi K, Bagdy G: Effects of handling or immobilization on plasma levels of 3,4-dihydroxyphenylalanine, catecholamines, and metabolites in rats. *J Neurochem* 58 : 2296-2302, 1992b.
- Kvetnansky R, Weise VK, Kopin IJ: Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology* 87 : 744-749, 1970.
- LeHoux JG, Sandor T, Henderson IW, Jones IC: Some aspects of the dietary sodium intake on the regulation of aldosterone biosynthesis in rat adrenals. *Can J Biochem* 52 : 1-6, 1974.
- Muller J: 11 $\beta$  hydroxylation of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone by rat adrenal tissue: zone specificity and effect of sodium and potassium restriction. *J Steroid Biochem* 13 : 253-257, 1980.
- Osterhout CA, Chikaraishi DM, Tank AW: Induction of tyrosine hydroxylase protein and a transgene containing tyrosine hydroxylase 5' flanking sequences by stress in mouse adrenal gland. *J Neurochem* 68 : 1071-1077, 1997.
- Palkovits M, Kobayashi RM, Kizer JS, Jacobowitz DM, Kopin IJ: Effects of stress on catecholamines and tyrosine hydroxylase activity of individual hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* 18 : 144-153, 1975.
- Pellegrini A, Soldani P, Gesi M, Lenzi P, Natale G, Paparelli A: Effect of varying noise stress duration on rat adrenal gland: an ultrastructural study. *Tissue and Cell* 29 : 597-602, 1997.
- Stachowiak M, Sebbane R, Stricker EM, Zigmund MJ, Kaplan BB: Effect of chronic cold exposure on tyrosine hydroxylase mRNA in rat adrenal gland. *Brain Res* 359 : 356-359, 1985.

- Tank AW, Lewis EJ, Chikaraishi DM, Weiner N: Elevation of RNA coding for tyrosine hydroxylase in rat adrenal gland by reserpine treatment and exposure to cold. *J Neurochem* 45 : 1030-1033, 1985.
- Tremblay A, LeHoux JG : Transcriptional activation of adrenocortical steroidogenic genes by high potassium or low sodium intake. *FEBS Letters* 317(3) : 211-215, 1993.
- Weiner N: Factors regulating catecholamine biosynthesis in peripheral and central neurons, In: Brady RO, ed, *The Basic Neurosciences*, 1 : 341-354, Raven Press, New York, 1975.
- Zigmond RE, Schon F, Iversen LL: Increased tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus of rat brain stem after reserpine treatment and cold stress. *Brain Res* 70 : 547-552, 1974.
- Zigmond RE, Schwarzshild MA, Rittenhouse AR: Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* 12 : 415-461, 1989.

#### < 국문초록 >

스트레스는 교감신경계와 부신을 활성화시킨다. 본 연구에서는 고염식이 흰 생쥐의 부신수질에 미치는 영향을 tyrosine hydroxylase (TH) 면역염색법과 투과 전자현미경을 이용한 미세구조적 관찰로 규명하였다.

1. 부신수질의 TH 면역반응은 고염식이 후 증가하였으며 특히 고염식을 4주간 시행한 경우보다 4일간 시행한 흰 생쥐에서 더 강하게 관찰되었다.

2. TH 면역반응은 부신수질을 구성하는 세포들 중 노르아드레날린 세포의 세포질과 과립들에서 주로 나타났다.

3. 고염식을 시행한 흰 생쥐 부신수질의 노르아드레날린 세포에서는 세포질 내에 비어있는 공간들, 분비과립이 팽대되어 과립 내 물질이 한 쪽으로 치우친 형태 및 손상된 미토콘드리아 등의 특징들이 관찰되었다.

이와 같은 결과는 고염식이 스트레스를 유발하는 요인이 될 수 있음을 시사해준다.

### FIGURE LEGENDS

- Fig. 3.** Electron micrographs of the adrenal medulla from the normal (a) and the high-salt diet mice (b; 4 days high-salt diet mouse, c & d; 4 weeks high-salt diet mice). Electron density of the noradrenaline cells (NA) is higher than that of the adrenaline cells (A). Especially, granules of the noradrenaline cells are more densely distributed in the high-salt diet mice. n, nucleus. Scale bar = 0.2  $\mu$ m
- Fig. 4.** Electron micrographs of adrenal medulla from the normal (a) and the high-salt diet mice (b & d; 4 days high-salt diet mice, c; 4 weeks high-salt diet mouse). There are some empty spaces in the cytoplasm (asterisks), expanded granules (arrowheads), and some damaged mitochondria (arrows) in the noradrenaline cells (NA). A, adrenaline cell, m, mitochondria, n, nucleus, rer, rough endoplasmic reticulum. Scale bars = 0.1  $\mu$ m

