

카드뮴 중독시 신장의 중탄산염 재흡수의 감소 기전

길영기¹, 임학², 안도환³

고신대학교 의과대학 해부학교실¹, 내과학교실², 생리학교실³

Mechanism of Reduced Bicarbonate Reabsorption in Cadmium-Intoxicated Rat Kidneys

Young Gi Gil¹, Hark Rim², Do Whan Ahn³

Departments of Anatomy¹, Internal Medicine², and Physiology³, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background We and others have demonstrated that cadmium (Cd) intoxication caused bicarbonaturia, reduced maxium transport of HCO_3^- , low plasma HCO_3^- level, and finally renal tubular acidosis. These findings imply that the transporters and/or enzymes that mediate HCO_3^- reabsorption may be inhibited. Therefore, we examined the changes in sodium-hydrogen exchanger type 3 (NHE3) and carbonic anhydrase IV (CA IV) enzyme in Cd-intoxicated rats. **Methods** Brush border membrane vesicles (BBMV) from renal cortex were prepared by Mg precipitation method. NHE3 activity in BBMV was measured by spectrofluorometry using acridine orange dye. The expression of NHE3 antigen was determined by immunoblot and immunohistochemistry. CA IV activity was measured by a end-point colorimetric method. **Results** Proton (H^+) permeability of BBMV prepared from Cd-treated rats was not different from that of control BBMV. Hofstee plot indicated that V_{max} of NHE3 activity was decreased in the cadmium group but K_{na} was not changed. Hill coefficient was also not altered by cadmium. Western blot showed that NHE3 antigen was reduced in Cd-treated rats compared to the control, which was confirmed by immunohistochemistry. CA IV activity was not changed. **Conclusion** The results demonstrate that the decreased expression of NHE3 in Cd-treated rats reduces bicarbonate reabsorption in the proximal tubule, which is likely to cause bicarbonaturia and renal tubular acidosis in Cd intoxication.

Key words : brush-border membrane, NHE3, bicarbonaturia

서론

카드뮴(Cd)은 강한 독성을 갖는 중금속으로서 호흡기를 통해 이 물질이 오랜기간 동안 흡입되면 폐암을,¹⁾ 음식물을 통해 장기간 체내에 축적되면 간, 신장, 골격계의

심각한 기능 손상을 초래한다. 카드뮴 중독에 의한 신장의 독성은 임상적으로 후천성 Fanconi 증후군과 유사한데 근위세뇨관의 재흡수 기능의 전반적인 손상으로 인해 요중 단백질 특히 $\beta 2$ -microglobulin 같은 저분자량단백질의 배설과 포도당, 아미노산, 인산염, 중탄산염과 같은 전해질 배설의 증가와 더불어 다뇨가 발생된다.²⁻⁶⁾ 신장이 카드뮴의 주된 표적기관이 되는 이유는 카드뮴이 신장의 근위세뇨관 세포에 대부분 축적되어 독성을 유발하기 때문이다. 이러한 신독성의 병태생리학적 과정은 먼저 체내에 흡수된 카드뮴이 간에 집적되고 간은 카드뮴을 중화시키는 단백질인 metallothionein (MT)을 만든다.

교신저자 : 안도환

주소: 606-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 생리학교실
Tel: 051-990-6415
Email: dwahn@ns.kosinmed.or.kr

* 본 연구는 고신대학교 의과대학의 기초임상 공동연구비(안도환, 1999)의 일부와 교수연구비(길영기, 2001)에 의해 수행되었음.

이어 Cd-MT복합체가 만들어지고 이것은 간세포로부터 혈중으로 유리되어 신장을 통해서 자유로이 여과된다. 여과후 이 복합체는 근위세뇨관 세포에 의해 endocytosis 과정을 통해 재흡수되며 세포내 lysosome의 단백질 분해 과정을 거쳐 MT는 아미노산으로 분해되며 이 과정에서 유리된 unbound Cd이 DNA, 세포소기관, 세포질단백질, 원형질막 등에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁷⁾

Molecular cloning 연구에 의하면 신세뇨관 상피세포에는 6가지 아형의 Na-H exchanger (NHE)가 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 이 가운데 NHE1은 basolateral membrane (BLM)에 존재하며 세포내 pH와 세포용적 조절에 관여하는데 비하여 NHE3는 brush border membrane (BBM)과 세포내 vesicle에 존재하며 HCO_3^- 재흡수를 통한 산-염기 균형과 Na재흡수를 통한 체내 Na 항상성 조절을 맡고 있다.^{8,9)} 정상상태에서 여과된 HCO_3^- 의 80%가 근위세뇨관에서 재흡수되며 이 중 2/3는 NHE3, 1/3은 H-ATPase에 의해 이루어진다. 먼저 여과된 HCO_3^- 는 세포로부터 관강내로 분비되는 H과 결합한 후 H_2CO_3 를 형성한 다음 carbonic anhydrase IV (CA IV)의 작용에 의해 CO_2 로 해리되어 세포내로 확산된다. 따라서 CA IV는 중탄산염 재흡수 과정을 촉진시키는 매개자 역할을 담당한다. 세포내로 확산된 CO_2 는 다시 H과 HCO_3^- 로 나누어지고 H은 상기 설명한 과정을 통해 분비되는 한편 HCO_3^- 는 Na- HCO_3^- cotransporter(NBC1) 또는 Cl- HCO_3^- exchanger(AE1)를 통해 혈액으로 재흡수 된다.¹⁰⁾

최근 안도환 등⁶⁾은 카드뮴에 중독된 쥐의 요중 중탄산염 배설이 증가하며, 신장의 중탄산염 최대이동능(TmHCO_3^-)은 저하되며, BBM의 Na-H exchange 활성은 감소되었다고 보고하였으며, Herak-Kramberger 등¹¹⁾도 카드뮴 중독시 혈중 중탄산염의 농도가 감소하며 BBM의 H-ATPase의 활성과 밀도가 모두 감소함을 보고한 바 있다. 이러한 결과는 카드뮴중독에 의해 신장의 중탄산염 재흡수가 손상됨을 시사한다.

따라서 본 연구에서는 카드뮴 중독시 신장의 HCO_3^- 재흡수의 감소가 근위세뇨관 BBM에 존재하는 NHE3와 CA IV 효소의 변화와 관련이 있는지를 조사했다.

방 법

실험동물과 요분석

체중 230-250 g의 Sprague-Dawley계 수컷쥐를 사용하여 체중 kg당 2 mg Cd을 CdCl_2 형태로 3주 동안 피하주사하여 카드뮴 중독을 유발시켰다. 대조군에는 동량의 0.9% 식염수를 주사했다. 3주후 실험동물들 한마리씩 대사상자에 넣고 사료와 물을 금식시킨 상태에서 24시간뇨를 받았다.

막소포의 분리

Ether로 쥐를 마취시킨 후 개복하여 대동맥을 통해 차가운 생리식염수를 관류시켜 신장의 혈액을 씻어낸 후 신장을 적출했다. 피질만을 분리하여 잘게 썰어서 mannitol완충용액 (300 mM mannitol 18 mM HEPES-10 mM Tris, pH 7.5)내에 1/10 (w/v)의 비율로 넣고 조직과 쇄기 (Potters homogenizer)를 이용하여 1,500 rpm에서 25회 왕복하여 균등액 (homogenate)을 만들었다. 균등액으로부터 막소포의 분리는 다음과 같이 시행했다.^{12,13)} 균등액을 냉동원심분리기 (Sovall RC-5B, superspeed centrifuge, SS-34)에서 3,000 rpm로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취한후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 하부의 검은 pellet은 버리고 상층액과 pellet의 연한 상층부분을 모아 다시 18,000 rpm에서 30분간 원심분리했다. 이것의 상층액과 하부의 검은 pellet은 버리고 fluffy layer만 모아서 MgCl_2 용액을 첨가하여 최종농도를 5 mM로 조정했다. 0°C에서 1시간 진탕한 후 3,500 rpm에서 15분 원심분리하고 상층액만 뽑아 다시 18,000 rpm에서 30분 원심분리다. 이 pellet이 세뇨관강막소포 (brush border membrane vesicle;BBMV)인데 이것을 loading용액 (100 mM sucrose, 150 mM TMA-gluconate, 20 mM HEPES/Tris, pH 6.0)에 넣고 실온에서 1시간 preincubation시켜 막소포내로 loading용액을 이동시킨 후 다시 원심분리했다. 최종 pellet의 단백질 농도는 대조군과 카드뮴처리군 모두 12 mg/mL되도록 조절하고 -70°C에 보관했다. 막소포가 세뇨관강막(BBM)으로부터 순수하게 얻어졌음을 확인하기 위해 BBM에만 존재하는 alkaline phosphatase와 세뇨관기저측면막(BLM)에만 존재하는 Na-K-ATPase 활성을 균등액과 비교했다. alkaline

phosphatase는 균등액에 비해 BBMV에서 7.5배 높은 반면 Na-K-ATPase는 2배 이했다. 이러한 결과는 강막이 순수하게 분리되었으며 강막소포에는 기저막소포가 약간 혼입되었음을 나타낸다. 막소포의 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay kit으로 측정했고 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용했다.

Fluorescence spectroscopy를 이용한 Na-H exchange의 동력학적 분석

막소포 내외의 pH경사의 변화를 측정하기 위해 Warnock 등^[4]이 고안한 acridine orange (AO) quenching 방법을 사용했다. 즉 6 μ M AO가 포함된 2 mL medium완충액(100 mM sucrose, 150 mM TMA-gluconate, 20 mM HEPES/Tris, pH 7.5)에 동일한 조성을 가진 pH 6.0인 BBMV분획 10 μ L를 첨가하면 약염기인 AO는 막소포내로 쉽게 확산되어 들어간다. 확산된 AO는 막소포내 H^+ 과 결합하여 AOH^+ 로 바뀌는데 이것은 막투과도가 거의 없으므로 막소포내에 머물게 된다. 따라서 이동된 AO의 양만큼 medium완충액의 AO 농도가 감소하고(이 현상을 quenching이라 일컫는다) 이러한 변화를 spectrofluorometer (SLM4000C)를 사용하여 excitation 493 μ m, emission 530 μ m에서 측정할 수 있다. 예비실험 결과 quenching은 40-50% 일어나며 K/H ionopore인 nigericin과 K-gluconate을 외부완충액에 첨가하여 pH 경사를 없애면 원래 형광의 95%까지 회복되었다. 동일한 원리를 적용하여 BBMV에 존재하는 Na-H exchanger 활성을 재기 위해 Na-gluconate 첨가했다. 이때 H은 막소포내부(pH 6.0)에서 외부(pH 7.5)로 향하는 경사를 따라 이동할 것이고 Na는 막소포외부에서 내부(0 mM)로 향하는 경사를 따라 움직이게 될 것이다. 이 경우 막소포의 Na-H exchanger에 의해 Na와 H의 교환은 빠르게 일어나면서 quenching이 회복된다. 본 실험에서는 Na 첨가 후 quenching이 회복되는 첫 3초를 Na-H exchange의 초기속도로 결정하여 동력학적 분석에 이용했다.

SDS-PAGE와 Immunoblotting

신피질 BBMV의 분리는 상기 방법으로 시행하되 mannitol 완충용액내 단백분해효소 억제제를 각각 PMSF 100 μ g/mL, pepstatin A 2 μ g/mL, leupeptin 1 μ g/mL 농도

로 첨가했다. 분리한 BBMV를 5% β -mercaptoethanol이 포함된 Laemli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 넣고 100°C에서 10분간 끓였다. 대조군과 카드뮴 처리군의 BBMV 단백질 50 μ g을 8% Tris-glycine gel (Novex, CA, USA)에 각각 loading하여 150V에서 80분 동안 전기영동시킨 후 nitocellulose membrane으로 단백질을 옮겼다. 비특이적 결합을 막기 위해 이 종이를 blocking buffer(5% nonfat dry milk, 0.1% Tween in PBS, pH 7.4)에 2시간 incubation시킨 후 1차 항체인 mouse anti-rat NHE3 monoclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 1:1000로 희석하여 1시간 incubation했다. 두 번의 수세 후 2차 항체인 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (Chemicon)를 1:4000으로 희석시킨 blocking buffer에 1시간 incubation한 후 충분히 씻어낸 다음 ECL kit (Amersham, Piscataway, NJ, USA)으로 signal을 확인했다. signal의 밀도는 Eagle Eye Still Video densitometer (Stratagene, La Jolla, CA, USA)로 측정했다.

면역조직화학(Immunohistochemistry)

쥐를 ether로 마취시킨 후 개복하여 신동맥 상부의 대동맥을 결찰하고 재빨리 하부 대동맥을 통해 신장으로 10 mL의 PBS를 관류시켰다. 다음 Bimesderfer 등^[5]의 방법과 유사하게 PLP고정액 (2% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium periodate, PBS, pH 7.4) 20 mL을 2-3분간에 걸쳐 관류시켰다. 신장을 적출한 후 상하로 이등분한 후 PLP고정액에 4시간 방치하여 후고정시키고 다시 30% sucrose buffer에 담가 밤새 침윤시킨 다음 대조군과 카드뮴군의 조직을 하나의 paraffin 포매패에 포함되도록 만들어 이후 과정에서 보일 수 있는 오차를 최소한으로 줄였다. 이 포매패를 5 μ m 두께로 박절하여 probe-on slide (Fisher Scientific Korea, Seoul, Korea)에 부착시키고 56°C에서 6시간 이상 건조한 후 xylene으로 탈파라핀시키고 고농도에서 저농도의 알코올을 사용하여 단계별 수세했다. 조직내 내인성 H_2O_2 의 작용을 억제하기 위해 3% H_2O_2 를 6분간 처리하고 잔여액을 immunoassay buffer (Biomed, Foster City, CA, USA)으로 씻어낸 다음 비특이적 결합을 방지하기 위하여 blocking buffer (Zymed, South San Francisco, CA, USA)로 15분간 반응시켰다. immunoblot에서 사용한 것과 동일한 1차항

체를 1:8로 희석하여 실온에서 90분간 반응시켰고, 2차항체는 1:100으로 희석하여 25분간 반응시켰다. 발색은 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)를 사용했으며 대조염색은 Mayer's hematoxylin을 사용했다.

Table 1. Urine flow and urinary excretions of protein and phosphorus in control and cadmium-exposed rats.

	Treatment	Control	Cadmium
Urine Flow ml/kg/day	baseline	30.7 ± 7.2	30.5 ± 4.8
	3-week	21.4 ± 4.3	37.3 ± 8.3*
Protein Excretion mg/kg/day	baseline	15.8 ± 2.4	18.7 ± 4.1
	3-week	28.2 ± 6.4	44.5 ± 11.0*
Phosphorus Excretion mg/kg/day	baseline	16.5 ± 10.9	10.8 ± 3.9
	3-week	14.0 ± 7.6	42.8 ± 9.2*

Cadmium group animals were subcutaneously injected with 2 mg Cd/kg/day for 3 weeks. The values represent the mean ± SD of 7 rats in each group.

* P < 0.05 vs. the matched control.

탄산탈수효소 (carbonic anhydrase isotype IV, CA IV) 측정

Brion 등¹⁶⁾의 방법에 따라 고무마개가 있는 시험관에 16G 바늘 2개를 꼽고 하나에는 시료를, 다른 하나는 100% CO₂가 들어있는 용기와 연결하되 CO₂의 유속을 분당 150 mL로 조절한다. 이 시험관을 얼음이 채워진 100 mL 비이커에 둔다. 먼저 BBMV 20 μ l (40 μ g 이하가 되도록 희석해서 사용함)와 증류수 480 μ l을 넣은 시험관에 CO₂를 충분히 공급하면서 20 mM imidazole, 5 mM Tris, 0.2 mM p-nitrophenol, pH 9.5의 조성을 가진 측정완충액 500 μ l를 Hamilton주사기로 넣고 반응을 시작한다. 이 경우 CO₂는 CA가 존재할 때 H₂O와 빨리 반응하여 탄산으로 바뀌므로 시험관내 용액은 산성으로 바뀐다. 그러면 지시자인 p-nitrophenol의 색깔이 무색으로 변화하는데 이 과정까지 소요된 시간이 CA의 활성을 의미한다. Brion 등¹⁷⁾에 의하면 근위세뇨관 강막에 존재하는 CA IV는 sodium dodecyl sulfate (SDS)에 노출되더라도 그 활성이 줄지 않은 반면 세포질에 존재하는 CA II는 SDS에 의해 활성이 없어진다. 따라서 BBMV에 함유된 CA II의 오

염을 줄이기 위해 SDS를 0.1% 포함시켰다. CA 활성도는 다음과 같이 계산했다: CA (EU/mg protein) = log(B/S)/(protein)*log2. 여기서 B는 시료를 끓여 시료내 CA활성을 완전히 없앤후 측정된 시간이며 S는 끓이지 않은 정상시료로 측정된 시간을, (protein)은 시료 20 μ l속에 들어있는 단백질의 양을 mg으로 표시한 것이다.

시약

단백효소 억제제, acridine orange, HEPES 등을 비롯한 일반시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입했다.

통계처리

실험결과는 평균값±표준편차로 표기했고 Student's t-test 및 covariance 분석을 통해 P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

결 과

카드뮴처리 시 신기능 변화

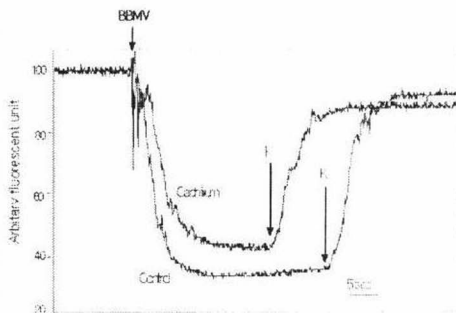
표 1은 카드뮴처리시 신기능 변화를 나타낸 것이다. 카드뮴 처리 3주후에는 대조군에 비해 요량은 1.7배, 단백질 배설은 1.6배, 인산염배설은 3.1배 증가하여 카드뮴 중독시 전형적으로 나타나는 다뇨, 단백뇨, 고인산뇨 등의 신기능 장애가 보였다.

Na/H 동역학적 변화

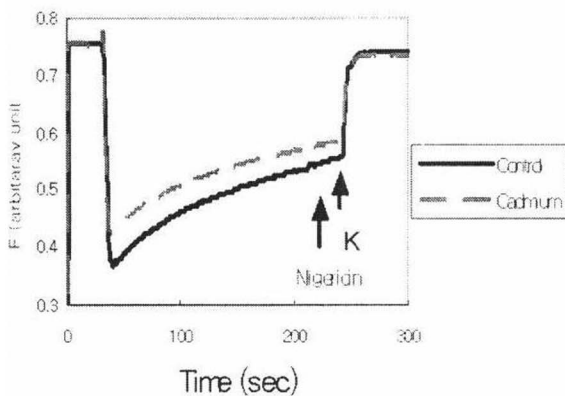
예비실험을 통해 다음의 세가지 결과를 얻었다: 1) K/H ionopore인 nigericin이 포함된 medium에 BBMV를 넣고 평형상태(steady state)에 도달한 다음 potassium (K)을 첨가하여 pH 경사를 소멸시킬 경우 BBMV를 넣기 전의 형광값의 95%까지 회복되었는데 (그림 1A) 이는 극히 일부의 acridine dye가 BBMV에 결합했는지 아니면 BBMV에 의해 excitation light가 산란되었음을 의미한다. 그러나 이러한 현상은 대조군과 카드뮴군의 BBMV에서 동일한 정도로 관찰되었다. 2) Quenching의 정도, 즉 막 소포(BBMV)를 첨가한 후 형광값이 감소하는 정도는 항상 카드뮴군의 BBMV가 대조군의 90%였는데(그림 1A와 1B), 이는 카드뮴군의 BBMV내 unsealed vesicle이 일부

존재하든지 또는 하나의 sealed vesicle의 막을 관통하고 있는 Na/H exchanger의 밀도가 대조군에 비해 카드뮴군에서 감소되었음을 나타낸다. 3) Na이 존재하지 않을 때 quenching의 회복, 다시말해 H의 농도경사에 따라 수동적으로 막소포내부의 H가 medium으로 빠져나오는 정도는 대조군과 카드뮴군에서 차이가 없었다 (그림 1B와 1C).

A



B



C

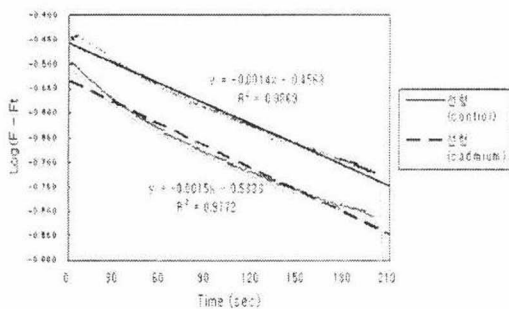


Fig. 1. Fluorescence quenching and proton efflux in BBMV from control and Cd-treated rats. BBMV with pH 6.0 were added to extravesicular buffer with pH 7.5. During the recovery phase K solution (final 25 mM) were injected at

appropriate interval as shown, respectively. (A) Acridine orange quenching. (B) Time course of fluorescence recovery from quenching. (C) Semilogarithmic plot of fluorescence recovery. Linear regression lines were drawn by a computer. Covariance analysis showed that the slope of the two lines, which represents efflux rate constant, were not different between the two groups.

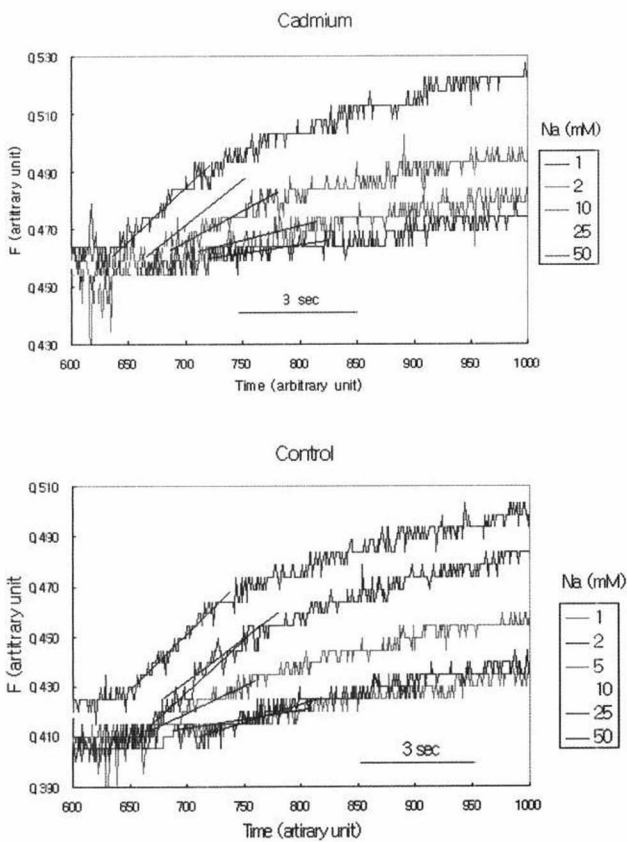
그림 2A는 Na를 첨가한 직후부터 Na/H exchanger가 작동하여 형광의 quenching이 회복되는 과정을 시간에 따라 관찰한 것이다. 여기서 Na/H exchanger의 초기속도-BBMV를 첨가한 직후부터 BBMV 안으로 Na의 influx만 일어날 때의 첫 3초 동안의 속도-는 그림으로부터 육안으로 tangent를 그려서 계산했다. 그림 2B에서 보듯이 대조군과 카드뮴군 모두 Na의 농도가 증가할수록 Na/H exchanger의 속도는 증가했다. 그러나 동일한 Na농도에서 대조군에 비해 카드뮴군의 초기속도는 현저하게 둔화되었다. 그림 2B는 그림 2A를 자료를 근거로 Hofstee plot으로 재구성한 것인데 기질의 친화력을 의미하는 K_{Na} 는 대조군이 4.77 (mM) 카드뮴군이 5.00이었으며, Na/H exchanger의 최대이동능을 나타내는 V_{max} 는 대조군이 148.7 (FU/min) 카드뮴군이 99.8로써 카드뮴군이 대조군의 67%였다. 이러한 결과는 카드뮴중독에 의해 BBM에 존재하는 Na/H exchanger (NHE3)의 Na 친화력은 거의 변화없이 NHE3의 밀도의 감소 또는 turnover rate의 감소를 의미한다. 그림 2C는 Hill plot을 나타낸 것이다. 대조군의 선형 regression 기울기는 1.248, 카드뮴군에서는 0.915이었지만 기울기의 covariance 분석 결과 양군간에 유의한 차이는 없었다. 이는 카드뮴 처치에 의해 Na-H exchanger의 Na 결합부위에서 Na cooperability가 변하지 않았음을 나타낸다.

Western blot과 조직면역화학

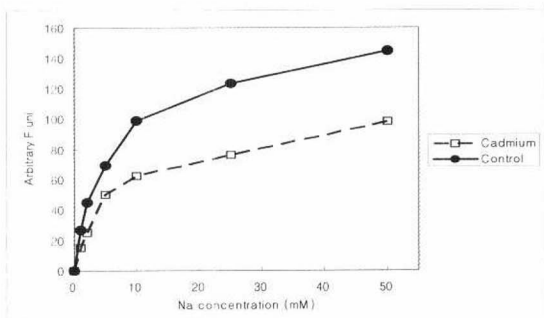
그림 2의 결과 카드뮴 중독시 BBM에 존재하는 NHE3의 활성도 감소가 이 이동계의 수적 감소에 기인한 것인지를 확인하기 위해 Western blot을 시행했다. 그림 3에서 보듯이 NHE3 단백질은 90 KDa에서 단일 signal을 보였다. densitometer로 밀도를 분석한 결과 NHE3 단백질의 양은 평균적으로 카드뮴군(204 ± 5 , 인위적 단위임)이 대조군(235 ± 30)의 83%이었다. 이같은 NHE3 단백질의 양적 변화가 단위 세뇨관에서도 나타나는지를 확인하기 위

해 면역조직화학을 시행했다. 그림 4는 paraffin section에서 NHE3 항원의 발현을 조사한 것이다. NHE3 항원성이 대조군의 근위세뇨관 BBM에서 강하게 염색되어 관찰되는 반면 카드뮴군에서는 매우 약하게 관찰되어 Western blot의 결과가 세포수준에서도 동일하게 반영됨을 확인했다. 뿐만 아니라 대조군에 비해 카드뮴군에서 근위세뇨관 BBM의 두께의 감소와 부분적 탈락이 보였고 단백질주도 관찰되었다.

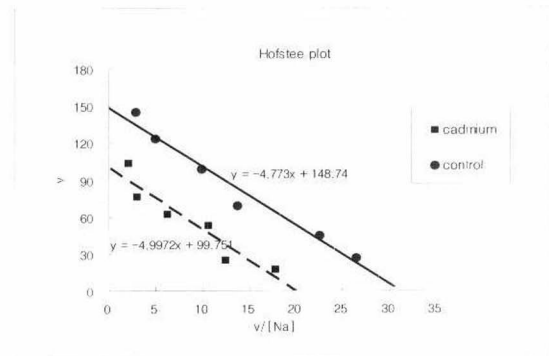
A



B



C



D

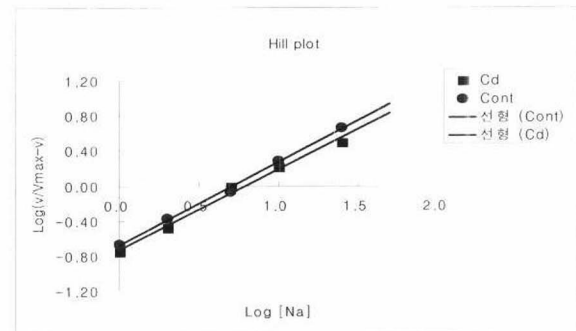


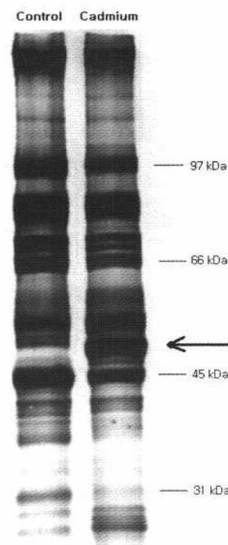
Fig. 2. The initial rate and capacity of Na-H exchanger of BBMVs from control and Cd-treated rats. The experimental condition was the same as in Fig.1. Within 10 seconds after adding BBMVs to the extravesicular buffer, the stock Na solution was injected to get the final Na concentration on each line. (A) The initial rate of fluorescence recovery. The Na-H exchange rate for initial 3 seconds was manually determined as the slope of a tangent line in each group. (B) Kinetics of Na-H exchange. (C) Hofstee plot. Covariance analysis indicates that the two regression lines are significantly ($P < 0.05$) different from each other in V_{max} , but not in K_{Na} . (D) Hill plot. Hill coefficients were 0.92 in control and 1.25 in cadmium group.

CA IV 활성화도

신장의 CA isozyme 중에서 CA II는 세포질내에, CA IV는 BBM에 존재하며 CA II가 95%, CA IV는 5%를 차지하며 BBM에서 HCO_3^- 재흡수를 직접 담당하는 단백질은 아니나 여과된 HCO_3^- 를 CO_2 로 빨리 변환시킴으로써 HCO_3^- 재흡수 효율을 도와준다.¹⁸⁾ 표 2에서 보듯 BBM에 존재하는 CA IV 활성화도는 대조군과 카드뮴군에서 통계

적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 본 실험에서 대조군의 실험간 변이계수(inter-assay CV)는 12.6%, 측정간 변이계수(intra-assay CV)는 5.5%이었고 카드뮴군에서는 각각 19.8%, 6.3%이었다. 한편 정상쥐에서 분리한 BBMV 36.4 ug를 사용하여 500 uM의 카드뮴을 37°C에서 30분 처리한 후 CA IV 활성을 측정한 in vitro 실험에서도 대조군이 17.0 ± 1.2 (sec), 카드뮴군이 18.6 ± 0.9 (n=5)로써 양군간에 차이가 없었다.

A



B

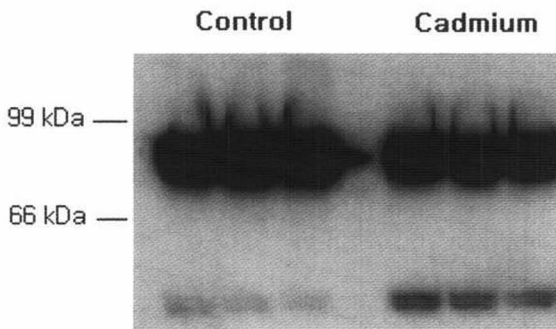


Fig. 3. The SDS-PAGE and immunoblot of NHE3 antigen in control and Cd-administered rats. (A) SDS-PAGE. Fifty ug of BBMV proteins was loaded in each group and separated on 8% gel. A band of about 50 Kda size was newly formed in cadmium-treated rats (Arrow). (B) Immunoblot. Signals were

visualized with ECL kit. Densitometric analysis showed a significant difference ($P < 0.01$) of NHE3 expression between the two groups (n=3, respectively).

고 찰

카드뮴은 생리학적 pH에서 2가 양이온을 나타내므로 이것은 음이온을 띠는 세포막-원형질막, 세포소기관의막, 핵막 등의 인지질과 정전기적으로 결합한다. 따라서 세포막을 관통하는 단백질, 즉 운반체, 이온채널, 효소 등의 생화학적 특성을 이차적으로 변화시킬 수 있다. 뿐만 아니라 이들 단백질의 음이온 부위에 결합하거나 SH기를 변형시켜 직접적으로 영향을 줄 수도 있다. 먼저 NHE3 단백질의 생화학적 특성이 카드뮴에 의해 변화되었는지를 조사한 것이 그림 2이다. 카드뮴군에서 분리한 BBMV의 NHE3 단백질의 H 투과도, Na 결합특성, Na stoichiometry는 대조군과 차이가 없었다. Park 등¹⁹⁾은 정상 쥐에서 분리한 BBMV에 카드뮴을 처리했을 때 Na-Pi cotransporter의 Na 결합특성, Pi 결합특성 및 Na stoichiometry가 변하지 않았음을 보고한 바 있다. 따라서 카드뮴에 의한 NHE3 활성도의 감소(그림 2B와 2C)는 적어도 이 단백질 자체의 생화학적 특성이 변화됨으로써 나타난 현상은 아닌 것으로 여겨진다.

NHE3의 생화학적 특성이 변하지 않았음에도 불구하고 카드뮴 중독 시 NHE3의 최대이동능(V_{max})은 33%정도 감소했는데(그림 2B), 이러한 결과는 다음 세가지 중 하나의 그 원인일 것으로 생각된다. 첫째, 카드뮴에 의해 NHE3가 직접적으로 억제되었다. Ahn 등¹²⁾은 in vitro 실험에서 카드뮴 농도가 증가할 때 BBM 운반체들의 운반능(transport activity)이 농도 의존적으로 억제됨을 발견하고 이는 카드뮴에 의해 이들 운반체가 직접 억제되기 때문이라고 설명했다. 실제로 카드뮴과 수은과 같은 중금속류들, 백금을 함유한 cisplatin이 운반체 단백질의 기능 활성화에 필수적인 SH기들은 불활성화시킨다.^{20),21)} 둘째 NHE3의 turnover rate가 감소되었다. Chung 등²²⁾의 연구에 의하면 정상 쥐에서 분리한 근위세뇨관 BBMV에 카드뮴을 직접 노출시켜도 Na-Pi cotransport 활성이 억제되는데 이 경우 Na-Pi cotransporter 숫자를 대표하는

PFA binding이 전혀 변화가 없었다. 이같은 사실로 미루어 카드뮴 중독 시 BBM의 막유동성(membrane fluidity) 변화에 의한 NHE3의 turnover rate 또한 감소되었을 것이다. 셋째, NHE3가 BBM에서 소실되었다. 세포막에서 운반체의 감소는 그 운반체의 mRNA 발현이 감소되고 이것이 단백질 합성의 감소로 이어짐으로써 그 생성량이 감소되거나 혹은 endosome에 의해 운반체의 trafficking 즉 insertional exocytosis 장애에 의해서도 그 생성량이 감소될 수 있다. Herak-Kramberger 등²³⁾은 카드뮴중독시 신피질내 Na-Pi cotransporter-2 (NaPi-2) mRNA양이 감소되고 BBM에서의 NaPi-2 단백질의 발현도 감소됨을 발견했다. Tabatabai 등²⁴⁾과 Blumental 등²⁵⁾은 일차배양한 생쥐 신피질세포에 카드뮴을 노출시켰을 때 Na-glucose cotransporter mRNA가 감소되며 Na-glucose cotransporter-1 단백질 (SGLT1) 발현이 감소됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서 비록 NHE3 mRNA 발현은 조사하지 못했지만 NHE3 단백질을 immunoblot과 면역조직화학법으로 조사한 바 카드뮴 처리에 의해 이 단백질의 발현이 현저히 감소했다. 따라서 카드뮴 중독시 NHE3의 최대이동능의 감소는 BBM의 NHE3 발현이 감소되기 때문인 것으로 생각된다. 다른 한편 NHE3의 trafficking 장애에 의해서도 BBM의 NHE3 발현이 감소됨을 배제할 수 없다. 세포의 NHE3 총량은 막에 결합된 양과 세포질내의 pool로 구성되며 이 두 구획 사이의 분포는 자극의 종류에 따라 endocytosis와 exocytosis의 상대적 크기에 따라 좌우된다.^{26,27)}

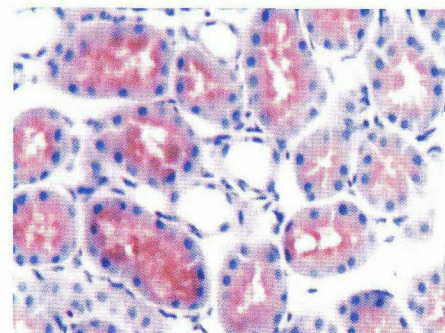
Herak-Kramberger 등²³⁾은 카드뮴 중독시 BBM의 NHE3 발현이 감소하는 것은 세포내 trafficking 과정의 필수 요인 중의 하나인 endosome내 H-APTase의 활성도와 이 단백질의 발현이 감소되어 insertional exocytosis가 억제되기 때문이라고 주장했다. Sabolic 등²⁸⁾도 Cd-metallothionein 복합체를 투여하여 카드뮴 중독을 유발한 모델에서 카드뮴이 microtubule을 depolymerization시키기 때문에 NHE3의 경우도 BBM과 세포내 사이의 재순환(recycling)이 저해되어 NHE3 발현이 감소한다고 주장했다. 비록 본 연구에서 세포막과 세포질에 각각 존재하는 NHE3의 발현을 따로 측정하지는 않았지만 카드뮴에 의한 trafficking과정의 장애 또한 BBM의 NHE3 발현 감소의 한 요인으로 작용했을 것으로 생각된다.

Table 2. Carbonic anhydrase IV activities in BBMV from control and Cd-intoxicated rats.

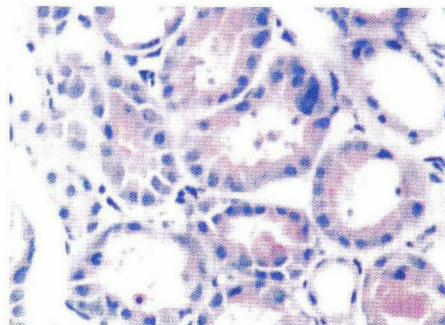
	CA IV activity (EU/mg protein)	P
Control	39.3 ± 4.96	
Cadmium	37.5 ± 4.72	0.70

Data are mean ± SD of 4 experiments conducted in triplicate.

일반적으로 카드뮴중독시 BBM에 존재하는 효소인 alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase, hydrolase 등의 활성도가 모두 억제된다. 그러나 본 실험에서는 CA IV 활성이 전혀 변화지 않았을 뿐만 아니라(표 2) 정상적인 쥐에서 분리한 BBM에 500 µM Cd를 처리한 in vitro 실험에서도 상기한 ex vivo 실험과 유사한 결과를 얻었다. CA는 아연과 결합된 metalloenzyme으로써 그 활성은 CA분자 구조내의 OH기가 다른 1가 음이온(Cl, I, Br, SCN)으로 치환될 때 활성도가 감소한다.²⁹⁾ 그러므로 2가 양이온인 카드뮴은 CA IV 활성도에 영향을 주지 못했던 것으로 여겨진다.



Control



Cadmium

Fig. 4. Immunostaining of NHE3 in control and Cd-intoxicated rats. NHE3 antigenicity in the proximal tubules

was greatly reduced in Cd-intoxicated rats than controls. Note the effacement of brush border, necrosis, and protein casts in proximal tubules of Cd-intoxicated rats. (Magnification: 200 x)

정리하면 신장의 근위세뇨관 BBM에서 HCO_3^- 재흡수는 NHE3, H-ATPase와 CA IV 효소의 총체적 작용으로 이루어지는데 카드뮴 중독시 중탄산염 재흡수의 감소는 궁극적으로 BBM에 존재하는 NHE3 단백질의 발현이 감소됨으로써 나타나는 현상인 것으로 여겨진다.

감사의 글

Spectrofluorometer를 사용한 실험을 도와주신 김경룡 교수님께 감사드립니다.

요 약

카드뮴 중독시 신장의 중탄산염 재흡수의 감소 기전을 밝히기 위해 근위세뇨관 brush border membrane (BBM)에 존재하는 Na-hydrogen exchanger-3 (NHE3)의 변화와 CA IV 효소의 변화를 측정했다. 카드뮴 처치에 의해 NHE3의 활성도뿐만 아니라 발현량도 감소되었다. 그러나 CA IV 효소의 활성도에는 변화가 없었다. 이러한 결과는 카드뮴 중독시 BBM의 NHE3 단백질 발현이 감소됨으로써 중탄산염 재흡수가 감소되는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Waalkes MP: Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 79: 241-244, 2000
2. Kim YK, Choi JK, Kim JS, Park YS: Changes in renal functions in cadmium-intoxicated rats. *Pharmacol Toxicol* 63:342-350, 1988
3. Lee HY, Kim KR, Woo JS, Kim YK, Park YS: Transport of organic compounds in renal plasma membrane vesicles of cadmium-intoxicated rats. *Kidney Int* 37:727-735, 1990
4. Ahn DW, Park YS: Transport of inorganic phosphate in renal cortical brush-border membrane vesicles of cadmium-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:239-243, 1995
5. Thevenod F, Friedman JM: Cadmium mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na-K-ATPase through proteosomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 13:1751-1761, 1999
6. Ahn DW, Kim KR, Choi JK, Park YS: Renal tubular acidosis in cadmium-intoxicated rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 6:41-46, 2002
7. Kjellstrom T: Renal effects. In: *Cadmium and Health: A toxicological and epidemiological appraisal vol II*. CRC press, Boca Raton, 1985, 22-87
8. Wakabayashi S, Shegkawa M, Pouyssegur J: Molecular physiology of vertebrate Na/H exchanger. *Physiol Rev* 7:51-74, 1997
9. Chow CW, Khurana S, Grinstein S, Orlowski J: The epithelial Na/H exchanger, NHE3, is internalized through a clathrin-mediated pathways. *J Biol Chem* 274: 37551-37558, 1999
10. Hamm LL: Renal acidification mechanism. In: *The kidney*, 7th ed., Brenner BM, ed. Philadelphia, WB Saunders, 2004, 497-534
11. Herak-Kramberger CM, Brown D, Sarbolic I: cadmium inhibits vacuolar H-ATPase and endocytosis in rat kidney cortex. *Kidney Int* 53:1713-1726, 1998
12. Ahn DW, Kim YM, Kim KR, Park YS: Cadmium binding and sodium-dependent solute transport in renal brush-border membrane vesicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 154:212-8, 1999
13. Sheikh MI, Kragh-Hansen U, Jorgensen KE, Roigaard-Petersen H: An efficient method for the isolation and separation of basolateral-membrane and luminal-membrane vesicles from rabbit kidney cortex. *Biochem J* 208:377-382, 1982
14. Warnock DG, Reenstra WW, Yee VJ: Na/H antiporter of brush border vesicles: studies with acridine orange uptake. *Am J Physiol* 242: F733-F739, 1982
15. Binesderfer D, Ruthford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-alfa AK, Aronson PS: Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol*:F289-F299, 1997
16. Brion LP, JH Schwarz JH, Zavilowitz BJ, Schwartz GJ: Micromethod for the measurement of carbonic anhydrase activity in cellular homogenates. *Anal Biochem* 175:289-297, 1988
17. Brion LP, JH Schwarz JH, Suarez C, Schwartz GJ: Metabolic acidosis stimulates carbonic anhydrase activity in rabbit proximal tubule and medullary collecting duct. *Am J Physiol* 266: F185-F195, 1994
18. Schwartz GJ: Physiology and molecular biology of renal carbonic anhydrase. *J Nephrol* 15:S61-S74, 2002
19. Park K, Kim KR, Kim JY, Park YS: Effect of cadmium on Na-Pi cotransport kinetics in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:255-259, 1997
20. Potdevin S, Courjault-Gautier F, Du Sorbier BM, Ripoché P,

- Toutain HJ: Role of protein thiols in inhibition of sodium-coupled glucose uptake by cisplatin in renal brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 284:142-150, 1998
21. Herak-Kramberger CM, Sabolic I: The integrity of renal cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged in vitro by nephrotoxic heavy metals. *Toxicology* 156:139-147, 2001
22. Chung JM, Ahn DW, Kim KR, Park YS: Changes in phosphate transporter activity evaluated by phosphonoformic acid binding in cadmium-exposed renal brush border membrane membrane. *Korean J Physiol Pharmacol* 3:513-519, 1999
23. Herak-Kramberger CM, Spindler B, Biber J, Murer H, Sabolic I: Renal type II Na/Pi-cotransporter is strongly impaired whereas the Na/sulphate-cotransporter and aquaporin 1 are not unchanged in cadmium-treated rats. *Eur J Physiol* 432:336-344, 1996
24. Tabatabai NM, Blumenthal SS, Lewand DL, Petering DH: Differential regulation of mouse kidney sodium-dependent transporters mRNA by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 177:163-173, 2001
25. Blumenthal SS, Ren L, Lewand DL, Krezoski SK, Petering DH: Cadmium decreases SGLT1 messenger RNA in mouse kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 149:49-54, 1998
26. Moe OW: Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: Role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol* 10:2412-2425, 1999
27. Chalumaeu C, Du Cheron D, Defontaine N, Kellermann O, Paillard M, Poggioli J: NHE3 activity and trafficking depend on the state of actin organization in proximal tubule. *Am J Physiol* 49:F283-F290, 2001
28. Sabolic I, Herak-Kramberger CM, Brown D: Subchronic cadmium treatment affects the abundance and arrangement of cytoskeletal proteins in rat renal proximal tubule cells. *Toxicology* 165:205-216, 2001
29. Maren TH: Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* 47: 595-781, 1967