

카드뮴 중독시 신장의 포도당 이동계의 변화

고신대학 의학부 생리학교실

이혜영, 박양생

Effect of Cadmium Intoxication on Renal Glucose Transport System

Hye Young Lee, M.D., Yang Saeng Park, Ph.D.,

*Department of Physiology
Kosin Medical College, Pusan 602-030, Korea*

= Abstract =

Effect of cadmium intoxication on the renal glucose transport system was studied. Subcutaneous injections of CdCl_2 (2mg $\text{Cd/kg} \cdot \text{day}$) for 2-3 weeks induced marked polyuria, glycosuria, and proteinuria without altering the glomerular filtration rate. In the renal cortical brush border membrane vesicles isolated from cadmium-treated rats, the Na^+ -dependent D-glucose uptake was markedly attenuated, and this was due to the reduction in V_{max} and not K_m . On the other hand, the Na^+ -independent uptake of glucose was not apparently altered. In the basolateral membrane vesicles, the uptake and the efflux of D-glucose was not significantly affected by cadmium treatment.

These results indicated that cadmium intoxication impairs the Na^+ -glucose cotransport system in the brush border membrane of renal proximal tubular cell.

1. 서 론

최근 급격한 중공업 발달의 부산물로서 수은, 납, 카드뮴 등 여러가지 중금속에 의한

중독증 환자가 속출하고 있으며 이에 따라 여러 임상 보고와 연구가 잇따르고 있다.

카드뮴은 카드뮴배터리, 전극판, 전도체 및 염화비닐안정제의 제조와 합금 등에 널리 쓰

이는 급속으로 근래에 그 생산량이 급증하고 있으며 이로 인한 카드뮴의 환경오염은 심각한 수준에 이르고 있어서 대기, 하천, 토양 심지어 식품에서조차 다량의 카드뮴이 검출된다고 한다. 이와 같은 여러 경로를 통하여 체내에 들어온 카드뮴은 각종 효소의 활성을 저하시키고 필수금속과 비타민 대사에 관여하여 신체의 항상성을 깨뜨리고 성장을 저해하며 각종 중독증상을 일으킨다³⁰⁾. 급성 중독증상으로는 폐부종을 들 수 있으며 만성 중독증상으로는 폐기종, 후각신경의 마비, 신기능 장애, 골연화증, 골변형, 골절 등을 일으키며 이로 인한 극심한 동통으로 일본에서는 “Itai-Itai” 병(혹은 “Ouch-Ouch” 병)으로 명명되기도 했다²⁰⁾.

카드뮴중독시 발생하는 가장 심각한 문제는 신기능 장애인데, 사구체보다는 신세뇨관에 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있어, Fanconi syndrome을 일으키는 여러 물질 중 카드뮴이 대표적 중금속 인자로 꼽힌다⁹⁾. 이렇게 선택적으로 신장의 기능적 장애가 초래되는 이유는 혈중의 중금속 운반단백질인 metallothionein에 의해 카드뮴이 신세뇨관 세포에 다량 축적되기 때문이다. 체내에 들어온 카드뮴은 일단 순환계로 들어가게 되는데, 간장, 소장 등에서 metallothionein이라는 분자량이 작은 중금속 운반단백질의 합성을 유도하여 Cd-metallothionein복합체를 이룬다. 혈중의 Cd-metallothionein복합체는 신장에서 사구체를 통하여 여과되며 근위세뇨관에서 다시 단백질 재흡수 기전에 의하여 신세뇨관세포내로 들어가게 되는데, 세포내에서는 lysosome의 효소에 의하여 분해되며 이 때 유리된 카드뮴 이온이 세포에 기능적 장애를 일으키며 심하면 신세뇨관 세포의 괴사를 초래한다²⁸⁾. 카드뮴에 의한 신기능 장애시 관찰되는 임상적 증상으로 다뇨증, 단백뇨, 당뇨, 아미노산뇨, 인산뇨 등이 보고되어 있으며^{1, 3, 16, 26, 27)} 이 중 당, 아미노산, 인산염 등은 주로 근위세뇨관에서 Na^+ 과의 cotransport과정을 통하여 재흡

수되는 것으로 알려져 있으나 카드뮴 중독시 이러한 cotransport과정이 어떻게 변화되는지에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 카드뮴에 중독된 쥐에서 분리된 신피질막소포(plasma membrane vesicle)를 이용하여 D-glucose이동 과정을 연구함으로써 카드뮴중독에 의한 당뇨의 발생 기전을 밝히고자 하였다.

2. 실험재료와 방법

1) 실험동물 : 실험동물로는 본 교실에서 계속 일정한 환경하에 사육한 Sprague-Dawley 계 웅성 백서(200-300 g)를 사용하였는데 실험군과 대조군 양 군으로 나누어 실험군에는 매일 체중 kg당 2mg의 카드뮴을 CdCl_2 의 형태로 2-3주간 피하주사하여 카드뮴중독을 유발하였으며 대조군에는 동량의 식염수를 주사하였다.

2) 요 및 혈장 분석 : 실험기간중 각 군의 신장 기능의 변화를 조사하기 위하여 1주일 간격으로 동물들을 metabolic cage에 넣고 24시간뇨를 채취하였는데 채취중 요중에 이물질이 혼입되는 것을 막기 위하여 24시간동안 사료와 물을 주지 않았으며 요수집 용기에는 파라핀유를 점적하여 요의 증발을 막았다. 요 채취가 끝나면 일단 요량을 측정하고 시료중의 단백질, creatinine 및 포도당의 함량을 분석하였는데, creatinine은 Wako Technical Bulletin No. 271-10509(Wako사, Osaka Japan)에 따라, 당은 Sigma Diagnostics No. 315(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)에 따라, 그리고 단백질은 Lowry등²²⁾의 방법으로 측정하였다. 약물 처치 기간이 끝난 후 동물을 희생하여 심장으로부터 혈액을 채취한 후 혈장내의 creatinine 농도를 위와 같은 방법으로 측정하였다.

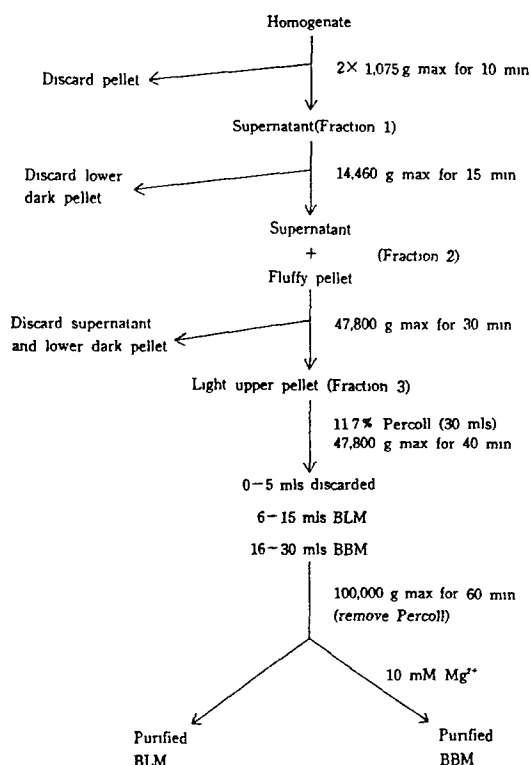
3) 신피질 조직으로부터 막소포의 분리 : 막소포의 분리는 언제나 실험군과 대조군에서 동시에 시행하여 실험 조건에 따라 나타날 수

있는 오차를 최소화하였다.

실험동물을 경부 탈골로 희생시켰으며 실험적 개복술 후 양쪽 신동맥이 분지하는 상부의 대동맥을 결찰하였고 140mM NaCl, 10mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 7.4)이 포함된 차가운 용액(4°C)을 하부 대동맥내에 주입하여 양쪽 신동맥을 통하여 흘러가게 함으로서 신장내의 혈액을 재빨리 제거하였다. 다음, 신장을 적출하여 피막을 벗기고 2~3mm 두께로 잘라 신피질을 분리한 후 잘게 잘라서 냉각된(4°C) sucrose 완충용액(250mM sucrose, 10mM triethanolamine, pH 7.4)내에 1/10 (w/v)의 비율로 넣고 조직파쇄기(motor-driven glass homogenizer with a tight-teflon pestle clearance 0.15mm)를 이용하여 1,800rpm에서 20회 왕복하여 homogenate로 만들었다. Homogenate로부터 막소포 분리는 Kinsella 등⁹과 Scalera 등³⁰⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 즉, homogenate를 refrigerated centrifuge(Sorvall RC-5B Centrifuge SS-34 Rotor)를 이용하여, 1,075×g로 10분간 원심침전시킨 후 상층액만 모으고 pellet을 원래 homogenate부피의 반이 되게 sucrose완충용액으로 희석하여 1,075×g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 먼저 취한 상층액과 합쳤다(Fraction 1). 이것을 다시 14,460×g에서 15분간 원심분리하여 하부의 검은 pellet은 버리고 상층액과 pellet 중 연한 상층부분을 같이 모아(Fraction 2) 다시 47,800×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액과 하부 검은 pellet은 버리고 fluffy layer만 모아서 26.5mL가 되도록 sucrose 완충용액을 가한 후(Fraction 3) 3.5mL의 Percoll(collidal silica particles의 현탁액)원액을 가하여 총량이 30mL, Percoll 농도가 11.7%가 되게 한 후 아래위로 흔들어 잘 혼합하고 47,800×g에서 40분간 원심분리하여 density gradient가 생기도록 하였다. 다음 피펫을 이용하여 상층으로부터 1mL씩 조심스럽게 분리하여 처음 0-4mL는 버리고, 5-15mL는 기저막소포(basola-

teral membrane vesicle, BLMV)분획으로 모으고, 마지막 16-30mL는 세뇨관강막소포(brush border membrane vesicle, BBMV)분획으로 모았다. 각 막소포분획은 초원심분리기(Sorvall OTD 75, Ultracentrifuge)를 이용하여 100,000×g로 1시간 동안 원심분리하여 가장 하부에 침전된 투명한 Percoll층을 제거하였다. BLMV분획은 100mM mannitol 100mM KCl, 20mM HEPES-Tris(pH 7.4)를 포함하는 완충용액으로 단백질 농도가 6-8mg/mL가 되도록 희석하고 26 gauge 주사침을 수회 통과시켜 막소포가 용액내에 고르게 분포되도록 하였으며, BBMV분획은 Mg^{2+} 침전법(7)을 이용하여 더욱 순도를 높였다. 즉, BBMV분획에 10mM $MgCl_2$ 가 포함된 완충용액 10mL를 가한 후 얼음물 속에서 60분간 진탕한 다음 1,705×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 따로 모으고 pellet에 동일한 완충용액을 가하여 혼합한 후 1,075×g로 다시 원심분리하여 상층액을 취하여 처음 상층액과 합친 다음 초원심분리기를 이용하여 100,000×g로 1시간 동안 침전시켰다. 침전된 막소포를 100mM mannitol 100mM KCl, 20mM HEPES-Tris(pH 7.4)가 포함된 용액과 혼합하였는데 그 방법은 BLMV분리시와 동일하였다. 분리한 막소포를 37°C에서 30분간 preincubation한 후 사용시까지 -70~-60°C에서 보관하였는데 분리 후 수일 이내에 모두 사용하였다.

4)Marker enzyme 활성도 측정 : $Na^+ - K^+ - ATPase$ 활성도는 Jørgensen과 Skou의 방법¹¹⁾에 의거 측정하였다. 약 0.25mg의 막단백을 포함하는 막소포분획을 2mM EDTA, 25mM imidazole 및 0.6mg/mL의 deoxycholate(pH 7.0)가 포함된 용액에 가하고 총량이 1mL가 되게 한 후 25°C에서 30분간 preincubation하였다. Preincubation이 끝난 후 혼합액을 100μL씩 취하여 histidine NaCl 및 KCl이 포함된 용액(total ATPase활성도 측정용)과 histidine NaCl 및 Ouabain이 포함된 용액(Mg^{2+}



-ATPase 활성도 측정용)이 각각 500 μ l씩 담긴 시험관에 가한 후 ATP와 $MgCl_2$ 가 포함된 용액을 각각 500 μ l씩 첨가함으로써 효소반응을 개시하였다. 이때 반응액중의 Na^+ , K^+ , histidine, Mg^{2+} , ATP 및 ouabain의 농도는 각각 130, 20, 30, 3.3 및 1mM였으며 pH는 7.5였고 incubation온도는 37°C였다. 10분간 incubation한 후 6% perchloric acid 200 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 시료를 얼음물 속에 보관하였다가 3,500 $\times$ g로 15분간 원심분리한 후 상등액내에 유리된 무기인산염의 양을 Fiske와 SubbaRow의 방법⁸⁾으로 측정하였다. Na^+ - K^+ -ATPase 활성도는 총 ATPase 활성도에서 Mg^{2+} -ATPase 활성도를 감한 값으로 하였으며 효소활성도는 μ moles Pi/mg protein $\cdot$ h로 표시하였다.

Alkaline phosphatase의 활성도는 Kind-

King의 방법(Wako Technical Bulletin No. 270~04609 for Serum Alkaline Phosphatase, Japan)에 의거 다음과 같이 측정하였다. 즉, 시료 50 μ l를 phenyl phosphate가 95mg/dl, 4-aminoantipyrine이 110mg/dl의 농도로 각각 포함되어 있는 0.05M carbonate 완충용액(pH 10.0) 2ml에 가하여 37°C에서 15분간 incubation한 후 발색시약(0.05M phosphate 완충액에 potassium ferricyanide가 2g/dl의 농도로 포함된 용액)을 2.0ml 첨가하여 반응을 중지시키고 발색될 때까지 수분간 기다렸다가 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준시약으로는 50mg/dl의 phenol을 사용하였으며 alkaline phosphatase의 활성도는 King-Armstrong units/mg protein $\cdot$ h로 표시하였다.

막소포분획의 단백질 농도는 Lowry 법²⁾에 의거 측정하였는데 표준 단백질로 bovine 혈청알부민을 사용하였고 단위는 mg/ml로 표기하였다.

5)막소포에서 물질 이동의 측정: 막소포내로의 포도당 이동은 급속여과법¹²⁾을 변형시킨 방법으로 측정하였다. 막소포분획(6-8mg protein/ml) 일정량을 8배 용량의 incubation용액(100mM NaCl, 100mM mannitol, 20mM HEPES-Tris, pH 7.4, 및 50 μ M D-[¹⁴C]-glucose)와 혼합하여 25°C에서 incubation하면서 적절한 시간 간격으로 100 μ l씩 취하여 진공펌프가 연결된 filter를 통하여 급속히 여과시켰다. 다음 5ml의 냉각된 정지용액(200mM NaCl, 0.5mM phlorizin)으로 filter를 세척한 후 scintillation vial에 넣고 methoxyethanol 1.0ml을 가하여 녹였다. 여기에 scintillation cocktail 10ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter (Packard Tricard 3000C)로 ¹⁴C의 방사능을 측정하였다. 사용된 Millipore filter는 HAWP(pore size 0.45 μ m)로서 실험 하루전에 증류수에 담가 두었다가 사용하였다. 막표면에 비특이적으로 결합된 D-[¹⁴C]-glucose양을 보정하기 위하여 막소포를 0.1%의 deoxycholate와 50 μ M D-[¹⁴C]-glucose

를 포함하는 용액에 1시간 동안 incubation한 후 100 μ l를 취하여 filter를 통해 여과시키고 상기의 방법으로 14 C방사능을 측정하였다. 막을 통한 glucose의 이동량은 비특이적으로 결합된 glucose의 양을 교정한 후 pmoles/mg protein으로 나타내었다. 막소포에서 Na^+ 이동을 조사할 때는 용액내에 ^{22}Na 를 넣고 incubation하였으며 그외 측정 과정은 포도당의 경우와 동일하였다.

6)사용된 시약 : D- ^{14}C -glucose와 ^{22}Na 는 Amersham International plc(Amersham, UK)로부터, Percoll은 Pharmacia Fine Chemical (Sweden)로부터, alkaline phosphatase와 creatinine 측정용 시약은 Wako사(Osaka, Japan)로부터, triethanolamine-HCl ouabain, ATP, bovine 혈청알부민, Tris 및 HEPES 등은 Sigma Chemical Co(St Louis MO USA)로부터 구입하였다.

7)통계학적 분석 : 모든 실험 결과는 평균치 $\pm$ 표준오차로 표기하였으며 각 군간의 차에 대한 유의성은 Students' t-test(unpaired comparison)로 검정하였다.

3. 실험결과

1) 카드뮴처치가 신기능에 미치는 영향 : 그림 1은 카드뮴처치전과 2주간 처치후에 실험동

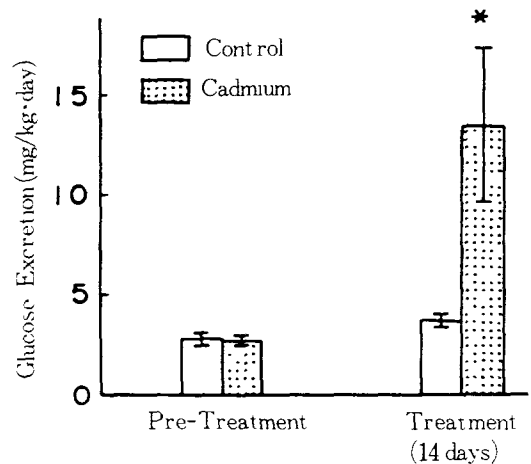


Fig. 1. Effect of cadmium treatment(2mg Cd/kg·day) on urinary excretion of glucose in rats. Data are mean $\pm$ SE of 4(Control) or 8(Cadmium) determinations.

*Significantly different($p < 0.01$) from the control value

물의 요중 포도당 배설량을 비교한 것이다. 처치전에는 대조군과 차가 없었으나 처치 2주 후에는 현저히 증가하여 그 값($13.2 \pm 3.9 \text{ mg/kg} \cdot \text{day}$)이 대조군(3.7 ± 0.4)에서보다 3배 이상 높았다. 표 1은 카드뮴 처치가 타 신기능에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 요량과 단백질 배설량의 경우 1주간 카드뮴 처치후에는 대조군과 차이가 없었으나, 2주간 처치후에는 대

Table 1. Effect of Cadmium Treatment on Renal Excretions of Water, Creatinine and Protein

	Days of Treatment	Saline (N=4)	Cadmium (N=8)	P
water (ml/kg · day)	0	22.4 ± 2.0	24.4 ± 2.0	NS
	7	28.6 ± 2.0	23.8 ± 1.9	NS
	14	25.8 ± 2.9	50.1 ± 7.4	<0.01
Creatinine (mg/kg · day)	0	33.6 ± 0.9	34.5 ± 3.1	NS
	7	36.2 ± 5.4	31.5 ± 3.9	NS
	14	32.6 ± 8.7	42.9 ± 10.6	NS
Protein (mg/kg · day)	0	233 ± 13	280 ± 21	NS
	7	274 ± 37	249 ± 21	NS
	14	276 ± 41	622 ± 150	<0.01

조균에 비해 2배 이상 증가하여 카드뮴 만성 중독환자에서 볼 수 있는 당뇨병과 단백뇨증 현상을 관찰할 수 있었다^{3,6,13 15)}. 그러나 creatinine 배설량은 카드뮴 처치전과 후에 모두 대조군과 차이를 보이지 않았는데 혈장내 creatinine농도(대조군에서 $3.2 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$; 카드뮴군에서 3.4 ± 0.4)역시 변화가 없었으므로 카드뮴 처치에 의해 신장의 사구체여과율에는 변화가 없었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 카드뮴 처치로 인하여 신사구체보다는 주로 신세뇨관 기능에 저해가 초래됨을 강력히 시사하고 있다.

2) 막소포의 효소활성도: 기저막의 marker enzyme인 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 및 세뇨관강막의 marker enzyme인 alkaline phosphatase의 활성도를 각기 측정된 바^{18 20)} 표2에 요약된 바와 같았다. Alkaline phosphatase의 경우, homogenate에서는 201 K-Aunits/mg protein·h 인데 비하여 BBMV분획에서는 1610K-Aunits/mg protein·h로서 homogenate 활성도의 약 8배에 달했으며, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 경우 homogenate에서는 $19 \mu\text{moles Pi/mg protein} \cdot \text{h}$ 인데 비하여 BLMV분획에서는 $165 \mu\text{moles Pi/mg protein} \cdot \text{h}$ 로서 homogenate 활성도의 약 8.6배였다. 그러나 BLMV분획에서 alkaline phosphatase의 활성도(502 K-A units/mg protein·h)가 homogenate 활성도의 2.5배, 그리고 BBMV분획에서 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 의 활성도 ($42 \mu\text{moles Pi/mg protein} \cdot \text{h}$)가 homogenate활성도의 약 2.2배로 나

타난 것은 BLMV분획에는 다소의 BBMV의 혼입이 있었고 BLMV분획에는 다소의 BBMV분획의 혼입이 있었음을 시사한다.

3) 막소포에서 물질이동의 측정: 먼저 BBMV분획에서 측정한 D-glucose의 이동이 단순히 막에 부착된 것이 아니라 막소포내로 이동된 것임을 확인하기 위하여 BBMV의 D-glucose축적량을 용액의 삼투질농도에 따라 조사하였다. 즉, 일정량의 BBMV분획을 $50 \mu\text{M}$ 의 D- ^{14}C -glucose와 여러 농도의 sucrose를 포함하는 incubation용액내에 1시간 동안 incubation한 후 막소포에 축적된 D-glucose의 양을 측정하였다. 후술하겠지만 Na^+ 부재시의 D-glucose이동은 1.5분 이내에 평형 상태에 도달하므로 1시간 incubation후에 측정된 D-glucose축적량은 만일 그것이 막소포내액에 존재하는 것을 나타낸다면 막소포 용적에 비례할 것이다. 막소포의 용적은 외부 용액내에 sucrose와 같이 세포막 투과도가 낮은 물질이 존재할수록 삼투성 물의 이동에 의해 감소될 것이며, 따라서 평형상태 때의 막소포내 D-glucose함량은 외부 용액의 삼투질 농도에 역비례하게 될 것이다. 실제로 BBMV의 glucose축적량은 그림2에 표시한 바와 같이 대조군에서나 카드뮴군에서나 모두 용액의 삼투질 농도의 역수에 직선적으로 비례하였으며 직선과 y축과의 교점, 즉 용액의 삼투질 농도가 무한대가 되어 막소포 용적이 0이 될 때의 D-glucose함량은 거의 0에 가까웠다. 이러한 결과는 막소포에 축적된 D-glucose는 단순히

Table 2. Activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and Alkaline Phosphatase in Renal Cortical Homogenates and Membrane Fractions

	Alkaline Phosphatase (King-Armstrong Units/mg Prot · h)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (umole Pi/mg Prot · h)
Homogenate	201	19
BBMV	1610	42
BLMV	502	165
BBMV/Homogenate	8.0	2.2
BLMV/Homogenate	2.5	8.6

세포막에 부착된 것(binding form)은 거의 없고 대부분이 실제 막소포내로 이동된 것임을 나타낸다. 그러나 동일한 삼투질 농도에서 보면 카드뮴군의 D-glucose 함량이 대조군에 비하여 다소 적었는데 이는 불완전하게 sealing된 막소포함량이 대조군에 비해 많음을 의미한다. 따라서 이 후의 모든 실험에서는 막소포의 glucose 함량을 대조군과 카드뮴군에서 각기 평형상태에 대한 상대치(% equilibrium value)로 표시하였다.

그림3은 100mM의 Na^+ 농도경사(막소포외액 > 막소포내액) 존재시 BBMVs 내 D-glucose 축적량의 변화를 보여준다. 이 실험에서 incubation 용액내에 Na^+ ionophore인 valinomycin을 2 μM 포함시켰는데 그 이유는 막내측에서 외측으로의 K^+ 확산전압을 발생시켜 막내부가 음전하를 띄게 함으로서 electrogenic process인 Na^+ -glucose cotransport를 촉진시키기 위함이었다^{5, 25, 35}. 대조군의 막소포에서는 incubation 초기에 D-glucose 축적량이 급격히 증가하다가 1.5분 후에는 다시 감소하여 점차 평형상태에 이르렀다. Incubation 30초 때의 D-glucose 축적량은 평형상태에 비해 약 2.5배가 많았는데 이는 D-glucose가 농도차에 역행해서 이동하였음을 나타낸다. 이처럼 incubation 초기에 일시적으로 평형상태 때보다 높게 막소포내에 물질이 축적되는 현상을 "overshoot"라고 하는데, 이러한 현상은 Na^+ 과 cotransport과정으로 이동되는 물질에서 볼 수 있는 공통적인 현상이다^{2, 31, 36}. 한편 카드뮴군의 막소포에서는 D-glucose의 초기 축적률도 대조군에 비해 낮을 뿐 아니라 overshoot 현상도 명확치 않았다. 이러한 결과는 카드뮴중독에 의해 신세뇨관막이 BBM에 존재하는 Na^+ -glucose cotransport system이 심하게 손상되었음을 시사한다.

그림 4는 incubation 용액내에 Na^+ 이 없을 때 BBMVs의 glucose 축적량을 보여준다. 대조군과 카드뮴군의 막소포에서 모두 D-glucose의 축적량은 처음 1.5분 동안에 점차 증가하

여 평형상태에 이르렀으며 어느 시간이나 양군간에 차가 없었다. 이러한 사실은 Na^+ 과 무관한 D-glucose의 이동은 카드뮴중독시 변화되지 않음을 나타낸다.

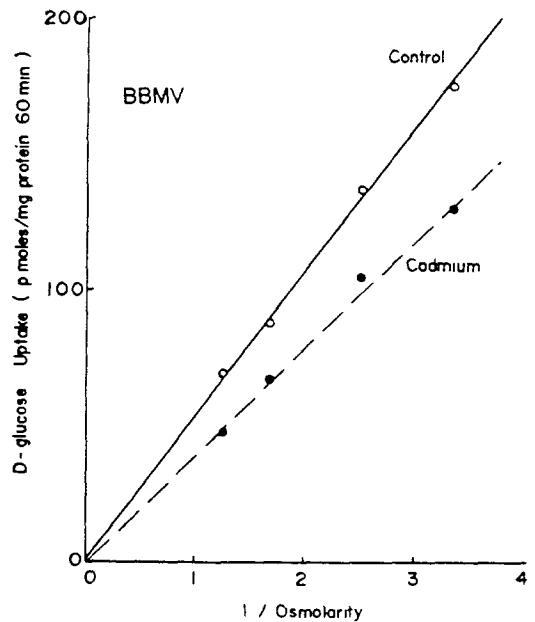


Fig. 2. Steady state accumulation of D-glucose by renal cortical brush border membrane vesicles(BBMVs) of control and cadmium-treated rats as a function of the reciprocal of medium osmolality. Vesicles containing 100mM mannitol, 100mM KCl, 20 mM HEPES-Tns(pH 7.4) were incubated in a medium containing 50 μM D-¹⁴C-glucose, 100mM mannitol, 100mM KCl, 20mM HEPES-Tns(pH 7.4). The osmolality of medium was changed by changing sucrose concentration. Each point represents the mean of 4 experiments.

신세뇨관강막(brush border membrane, BBM)에서 Na^+ -glucose cotransport를 일으키는 원동력은 막을 통한 Na^+ 의 전기화학적 경사도(electrochemical gradient)이다^{2, 11, 31}. 따라서 만일 BBM의 Na^+ 투과도가 카드뮴중독시 증가된다면 Na^+ 이 포함된 용액에 BBMVs를 incubation할 때 막소포내외의 Na^+ 경사도

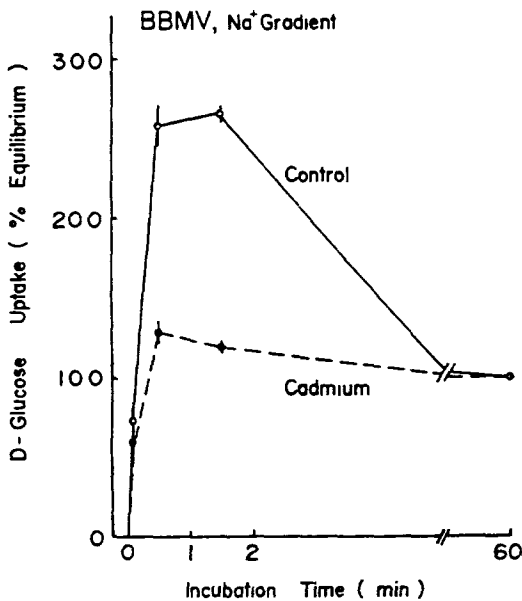


Fig. 3. Time course of Na^+ -dependent D-glucose uptake by renal cortical BBMVs of control and cadmium-treated rats. Vesicles containing 100mM mannitol, 100 mM KCl and 20mM HEPES-Tris(pH 7.4) were incubated in a medium containing $50 \mu\text{M}$ D- ^{14}C -glucose, 100mM mannitol, 100mM NaCl, 20mM HEPES-Tris (pH 7.4) and $2 \mu\text{M}$ valinomycin at 25°C . Values are expressed as percentage of D-glucose taken up by the vesicles after 60 min incubation (116 ± 10 p moles/mg protein in control and 75 ± 6 in cadmium group). Each datum represents the mean $\pm$ SE of 7 experiments

가 급히 사라질 것이므로 cotransport과정으로 이동되는 D-glucose량이 대조군에 비해 적을 것이다. 이러한 가능성을 조사하기 위하여 대조군과 카드뮴군의 BBMVs를 각각 ^{22}Na 및 100mM의 Na^+ 을 포함하며 D-glucose를 포함하지 않은 용액내에 incubation하면서 막소포 내로의 Na^+ 축적을 조사하였는데, 그 결과는 양 군간에 아무런 차이가 없었다(그림5). 이러한 사실은 카드뮴중독시 BBM의 Na^+ 투과도는 변화되지 않음을 나타내며, 따라서 BBMVs의 Na^+ -dependent glucose uptake의

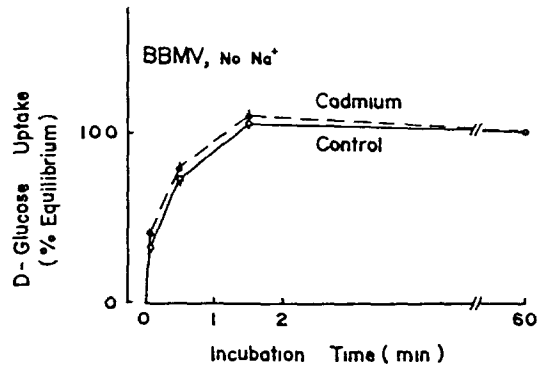


Fig. 4. Time course of Na^+ -independent uptake of D-glucose by renal cortical BBMVs of control and cadmium-treated rats. Vesicles containing 100mM mannitol, 100 mM KCl, 20 mM HEPES-Tris(pH 7.4) were incubated in a medium containing $50 \mu\text{M}$ D- ^{14}C -glucose, 100mM mannitol, 100 mM KCl, 20mM HEPES-Tris(pH 7.4) and $2 \mu\text{M}$ valinomycin at 25°C . Values are expressed as percentage of D-glucose taken up by the vesicles after 60 min incubation (142 ± 9 p moles/mg protein in control and 108 ± 6 in cadmium group). Each datum represents the mean $\pm$ SE of 4 experiments.

감소는 Na^+ -glucose cotransport system의 저해 때문임을 알 수 있었다.

다음은 Na^+ -glucose cotransport 과정이 카드뮴중독시 저해되는 기전을 규명하기 위하여 BBMVs의 Na^+ -dependent D-glucose축적을 동력학적으로 분석하였다. 그림6은 대조군과 카드뮴군의 BBMVs에서 100mM Na^+ 농도경사도 존재시 처음 5초 동안에 축적되는 D-glucose의 양(이를 초기이동률, initial velocity로 간주하였음)을 용액내의 D-glucose농도에 대한 함수로 나타낸 것이다. 대조군에서나 카드뮴군에서나 실제 측정치(실선)는 용액내 D-glucose농도가 증가함에 따라 곡선적으로 증가하였다. 그런데 실제 측정치에는 운반체에 의하여 이동된 부분(carrier-mediated transport)과 단순확산에 의해 이동된 부분(simple diffusion)이 모두 포함되어 있으므로 동력학

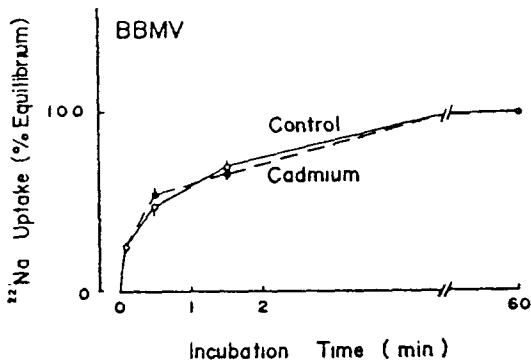


Fig. 5. Time course of Na^+ uptake by renal cortical BBMVs of control and cadmium-treated rats. Vesicles containing 100mM mannitol, 100mM KCl, 20mM HEPES-Tns(pH 7.4) were incubated in a medium containing $100 \mu\text{M}$ ^{22}Na , 100mM NaCl, 100 mM mannitol and 20 mM HEPES-Tns(pH 7.4) at 25°C . Values are expressed as percentage of the Na^+ uptake after 60min incubation (203 ± 11 pmoles/mg protein in control and 187 ± 11 in cadmium group). Each datum represents the mean $\pm$ SE of 4 experiments.

적 분석을 위하여 다음과 같이 후자를 보정하였다. 즉, 운반체에 의한 이동량은 용액내 기질(substrate)농도가 높아지면 포화될 것이나 확산량은 기질 농도에 정비례할 것이므로 운반체가 포화된 다음에 일어나는 전체 이동량의 증가는 확산량의 증가에 의해서만 나타나게 된다. 그러므로 기질 농도가 아주 높을 경우에는 막소포내 D-glucose 축적량이 용액내 D-glucose 농도에 따라 직선적으로 증가하게 되며 이 직선과 평행하게 원점을 통과하는 직선(그림 6의 점선)을 그으면 그것이 확산량에 해당한다. 이렇게 추산한 확산량을 전체 이동량에서 감하여 운반체에 의한 이동량(carrier-mediated transport)을 산출한 후 Hofstee plot의 형태로 나타낸 것이 그림 7의 (A)인데, 대조군과 카드뮴군의 BBMVs에서 모두 D-glucose 이동량(v)과 이동량/기질($v/[S]$) 비 사이에 곡선적인 상관성을 보였다. 이러한 결과는 D-glucose 이동이 한 종류 이상의 운

반체에 의하여 매개되었음을 의미하는데, 이는 아마도 본 실험에 사용된 BBMVs 분획이 근위세뇨관의 여러 부위에서 유래된 때문인 것 같다. Barfuss 및 Schafer⁴에 의하여 시행된 적출된 토끼 근위세뇨관 관류실험에 의하면 근위세뇨관의 상부(early segment)에 존재하는 포도당 운반체는 high capacity-low affinity system이고 하부(late segment)에 존재하는 포도당 운반체는 low capacity-high affinity system이라고 하는데, 막소포 실험에서는 전자는 외측 피질조직의 BBMVs에서, 그리고 후자는 외측 수질의 BBMVs에서 각기 확인된다고 한다³³. 그러나 본 실험에서는 쥐의 신장을 사용한 관계로 신피질을 내측과 외측으로 분리하기 곤란하여 전체 신피질조직으로부터 막소포를 분리하였으며 그 결과 두 종류의 포도당 운반체가 모두 포함되었을 것으로 사료되어 carrier-mediated D-glucose transport를 다음과 같이 두 부분으로 분해하였다.

$$v = v_1 + v_2 = \frac{V_{\max 1}[S]}{K_{m1} + [S]} + \frac{V_{\max 2}[S]}{K_{m2} + [S]}$$

(단, v_1 은 low capacity-high affinity system에 의한 이동률, 그리고 v_2 는 high capacity-low affinity system에 의한 이동률이다.)

그림 7(A)에서 $v/[S]$ 값이 아주 높을 때의 v 는 주로 high affinity system에 의한 이동률을 나타낼 것이며, $v/[S]$ 가 낮을 때는 high affinity system과 low affinity system에 의한 이동이 혼합된 이동률을 나타낼 것이다. 그러므로 $v/[S]$ 가 높을 때 얻어지는 직선의 방정식으로부터 $V_{\max 1}$ (즉, 직선과 y축과의 교점)과 K_{m1} (직선의 기울기)을 각각 산출하고 이 값들을 Michaelis-Menten 수식에 대입하여 여러 가지 $[S]$ 에서의 v_1 을 산출한 후 v 에서 v_1 을 감하여 v_2 를 산출하였다. 이렇게 산출된 v_1 과 v_2 에 대해 Hofstee 분석을 시행한 바 그림 7(B)에 표시한 바와 같이 high capacity-low affinity system과 low capacity-high affinity system에서 모두 카드뮴 중독에 의해 $V_{\max}$ 는 감소되었으나 K_m 은 변화가 없는 것으로 나타

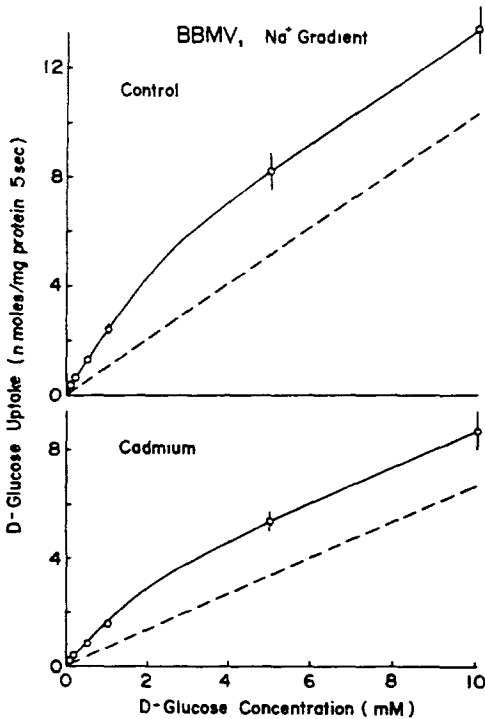


Fig. 6. Initial (5 sec) rate of Na^+ -dependent D-glucose uptake by renal cortical BBMVs of control and cadmium-treated rats as a function of D-glucose concentration in the medium. Compositions of intra- and extravesicular media, other than substrate concentration, are the same as described in Fig. 3. Incubation temperature was 25°C . The dashed line represents the nonsaturable component. Values are mean $\pm$ SE of 4 experiments.

났다. 이러한 결과는 카드뮴중독시 근위세뇨관의 상부와 하부에서 모두 포도당 운반체가 감소됨을 시사한다.

다음은 카드뮴중독이 신세뇨관세포의 기저막에 존재하는 포도당이동계에 어떠한 영향을 미치는가를 알아 보기 위하여 대조군과 카드뮴중독군의 신피질 BLMV에서 D-glucose의 이동을 비교하였다. 그림 8은 100mM Na^+ 농도경사(막소포외액 > 막소포내액) 존재시 BLMV의 D-glucose 축적량을 보여주는데, 축적량은 incubation 초기에 급격히 증가하다가

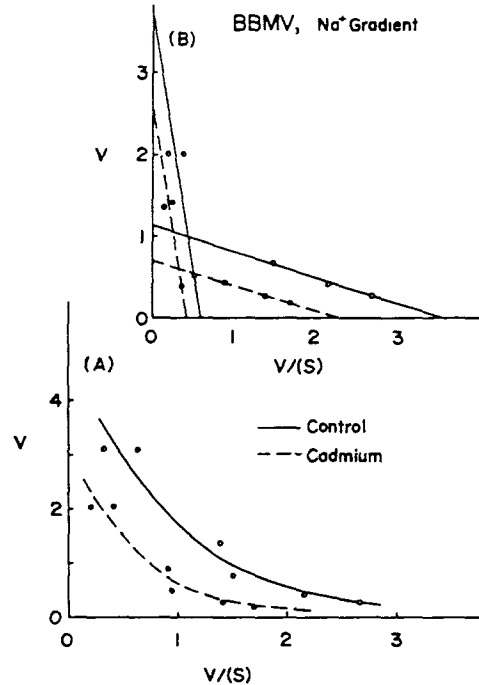


Fig. 7. (A) Hofstee plot of the carrier-mediated component of D-glucose uptake.

(B) Resolution of carrier-mediated component of D-glucose uptake into a high affinity-low capacity system and a low affinity-high capacity system. The way of resolution is described in the text. Data are based on Fig. 6.

1.5분 후에는 서서히 증가하여 평형상태에 이르렀으며 어느 시간에서나 양 군간에 유의있는 차가 없었다. 다음, BLMV 내부로부터 외부로의 D-glucose efflux를 측정하였는데, 먼저 BLMV 분획을 D- ^{14}C -glucose ($1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$)를 포함하는 용액내에 60분간 incubation하여 막소포내에 D- ^{14}C -glucose를 채운 다음 incubation mixture를 방사성동위원소가 제외된 용액으로 50배 희석한 후 다시 incubation하면서 적당한 시간간격으로 일정량씩 취하여 막소포내 남아있는 D- ^{14}C -glucose의 양을 측정하였다. 그림 9는 efflux 시간에 따른 막소포내 D- ^{14}C -glucose 함량의 상대적 변화를 semilog plot로 나타낸 것인데, 대조군과 카드뮴중독군의 BLMV에서 efflux rate constant(직

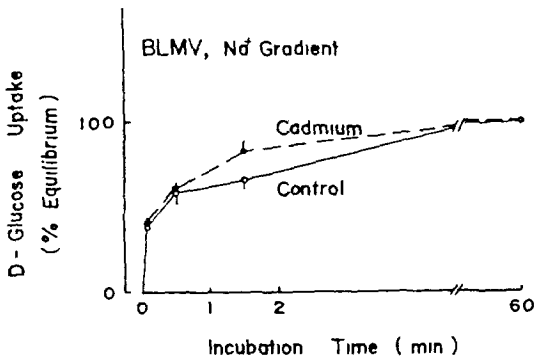


Fig. 8. Time course of D-glucose uptake by renal cortical basolateral membrane vesicles (BLMV) of control and cadmium-treated rats. The condition of incubation was identical to that described in Fig 3. Values are expressed as percentage of equilibrium (60 min) level (121 ± 6 pmol/mg protein for control, 94 ± 4 for cadmium group). Values are mean $\pm$ SE of 6 experiments.

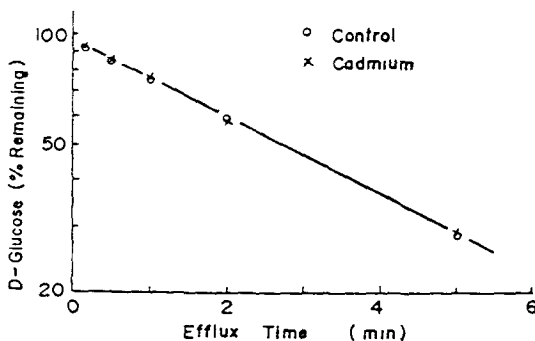


Fig. 9. Efflux of D-glucose by renal cortical BLMV of control and cadmium-treated rats. Vesicles were loaded with D- 14 C-glucose, by incubating them in a medium containing $1 \mu\text{Ci}$ D- 14 C-glucose/ml, 0.1 mM D-glucose, 100 mM mannitol, 100 mM KCl and 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4) for 60 min at 25°C . The mixture was then diluted (1/50) with a ^{14}C -free medium and incubated for various periods. The percentage of radioactivity remaining in the vesicle at the end of each efflux period was plotted as a function of time using a semi-logarithmic plot. The slope of the line represents the rate of efflux.

선의 기울기)에 차가 없었다. 이러한 결과는 카드뮴중독이 신세뇨관세포의 기저막에 존재하는 포도당이동계에는 아무런 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

4. 고 찰

신장에서 당은 근위세뇨관에서 Na^+ 을 필요로 하는 능동적 이동기전에 의해 재흡수됨이 과거 여러 학자들에 의해 밝혀진 바 있다. Loeschke 등²¹⁾은 쥐의 신장에서 시행한 micro-puncture 실험을 통하여 근위세뇨관에서 당이 재흡수되는 것을 확인하였으며 Tune 등²²⁾은 적출된 신세뇨관 관류(isolated tubular perfusion) 실험을 통하여 근위세뇨관의 곡부와 직부에서 모두 당이 재흡수되나 곡부에서의 이동율이 더욱 큰 것을 관찰하였으며 근위세뇨관 세포내의 당의 농도가 세뇨관내액보다 훨씬 높은 것을 확인하여 농도차에 역행한 능동적 당의 이동이 세뇨관장막에서 일어남을 증명하였다. 그 후 Ullrich 등³⁷⁾은 쥐에서 시행한 세뇨관주위 모세혈관 관류(peritubular capillary perfusion) 및 stop flow microperfusion 실험에서 6탄당의 능동적 재흡수 과정에는 반드시 Na^+ 이 필요함을 관찰하였다. 이러한 사실들은 그 후 신피질에서 분리된 막소포를 이용한 실험에서 널리 증명되었으며^{5, 18, 35)} 따라서 신장의 포도당 재흡수 과정을 세포막 수준에서 연구함에 있어 막소포법(isolated membrane vesicle technique)이 널리 이용되고 있다.

카드뮴중독시 관찰되는 여러 신기능 변화 중 가장 전형적인 것으로 당뇨현상을 들 수 있다.^{16, 27)} 본 실험에서는 요 분석을 통하여 카드뮴중독에 의한 당뇨를 확인하였으나 사구체여과율은 카드뮴중독에 의하여 변하지 않는 것으로 나타났는데 이는 카드뮴치치에 의한 세뇨관 기능의 저해로 인하여 사구체를 통하여 여과된 포도당이 세뇨관에서 모두 재흡수되지 못하고 일부 요중으로 배설된 것임을 의미한다. 이러한 사실은 과거 본 교실에서 시

행한 타 연구¹⁷⁾에서도 밝혀진 바 있으나 세뇨관의 저해부위와 저해 기전에 대해서는 명확히 밝혀진 바 없다.

본 연구에서 관찰된 바에 의하면 카드뮴을 처리한 쥐의 신피질에서 분리한 BBM에서 Na^+ -dependent glucose 이동량은 대조군에 비하여 현저히 감소하였으나(그림3), Na^+ 과 무관한 포도당의 이동이나(그림 4) Na^+ 의 투과도(그림5)에는 변함이 없었고 또 BLMV에서의 포도당의 이동(그림8과 9)역시 카드뮴 처리에 의하여 거의 영향을 받지 않은 것으로 나타났는데, 이는 카드뮴 처리에 의하여 BBM에 존재하는 Na^+ -glucose cotransport 기전이 선택적으로 심하게 저해되었음을 시사한다.

이러한 저해 기전을 좀 더 상세히 분석하기 위하여 동력학적 분석(그림7)을 시행한 결과 카드뮴에 의한 Na^+ -glucose cotransport의 저해는 K_m 치에는 변함이 없이 V_{max} 치의 감소로 인함을 알 수 있었다. 즉, 운반체의 당에 대한 친화력에는 변함이 없이 유효한 운반체(effective carrier)의 숫적인 감소가 초래됨을 나타내었는데 그 감소기전은 알 수 없었다. 아마도 운반체의 일부가 소실되었거나 혹은 막의 지질 성분이 변화되었을 것으로 추정되는데, 후자의 경우 신장의 BBM은 sphingomyelin과 phosphatidylserine의 함량이 높고 인지질에 대한 콜레스테롤의 비율이 큰 것으로 알려져 있으며²⁴⁾ 이러한 막지질의 구성비가 변할 때 K_m 치의 변화없이 V_{max} 가 감소한다는 보고가 있어서²⁵⁾ 그 가능성이 매우 크다고 하겠다. 따라서 포도당운반체에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 사용하여 운반체의 숫적인 감소를 분석하거나^{10,34)} 막지질을 분석하여 V_{max} 감소의 기전을 밝히는 일은 앞으로의 연구과제로 여겨진다.

생체내에서 신장의 포도당 재흡수의 1차적인 과정은 BBM을 통한 Na^+ -glucose cotransport이므로 본 실험에서 관찰된 바와 같이 카드뮴중독시 이 과정이 강력히 억제됨은 그 기

전 여하에 불문하고 당뇨 발생의 1차적 요인이라 하겠다. 그러나 이 과정을 통한 당의 이동의 원동력인 Na^+ 농도경사는 궁극적으로 기저막에 존재하는 Na^+ -pump에 의해 마련되므로³⁶⁾ Na^+ -pump의 기능적 저해시 세뇨관의 포도당 재흡수는 감소할 것이다. 이와 관련하여 일부 저자들이 카드뮴 처리에 의하여 신피질의 Na^+ - K^+ -ATPase의 활성도가 감소한다고 보고한 바 있는데¹⁷⁾, 그것이 사실이라면 이 또한 카드뮴 중독시 관찰되는 당뇨의 발생에 일부 기여할 것으로 사료된다.

5. 요 약

카드뮴이 신장에 존재하는 포도당이동계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2-3주간 체중 kg 당 2mg의 카드뮴을 쥐에게 매일 피하주사하여 카드뮴중독을 유발하였으며, 그 결과 사구체여과율에는 변함이 없이 다뇨증, 당뇨 및 단백뇨 등이 관찰되었다. 카드뮴중독을 일으킨 쥐에서 분리한 BBM을 이용하여 glucose 이동을 조사한 바 Na^+ -dependent D- ^{14}C -glucose가 심하게 저해되었는데, 동력학적 분석을 통하여 이는 K_m 치에는 변함이 없이 V_{max} 치가 감소된 결과임을 알 수 있었다. 그러나 BLMV에서 시행한 D-glucose uptake이나 efflux 실험에서는 D-glucose 이동이 전혀 저해되지 않았는데, 이는 BLM의 포도당이동계는 카드뮴 처리에 의하여 손상되지 않았음을 의미한다.

따라서 카드뮴중독시 발생하는 당뇨는 주로 근위세뇨관의 세뇨관강막에 존재하는 Na^+ -glucose cotransport system의 저해에 기인함을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Adams RG, Harrison JF & Scott P :
The development of cadmium-induced proteinuria, impaired renal function, and osteomalacia in alka-

- line battery workers QJ Med 38 : 426~443, 1969
2. Aronson PS, Sacktor B : The Na⁺ gradient-dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane J Biol Chem 250 : 6032~6039 1975
3. Axelson B, Piscator M : Renal damage after prolonged exposure to cadmium An experimental study Arch Environ Health 12 : 360~373, 1966
4. Barfuss DW, Shafer JA : Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron Am J Physiol 240(Renal, Fluid, Electrolyte Physiol 9) : F322~F332, 1981
5. Beck JC, Sacktor B : The sodium electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles J Biol Chem 253 : 5531~5535, 1978
6. Bernard A, Lauwerys R, Gengoux P : Characterization of the proteinuria induced by prolonged oral administration of cadmium in female rats Toxicology 20 : 345~357 1981
7. Booth AG, Kenny AJ : A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney Biochem J 142 : 575~581 1974
8. Fiske CH, SubbaRow Y : The colorimetric determination of phosphorus J Biol Chem 66 : 375~400, 1925
9. Friedman AL, Chesney RW : Isolated renal tubular disorders In : Diseases of the kidney, Eds : Schrier RW, Gottschalk CW pp 673~675, 1988
10. Glossmann H, Neville DM Jr : Phlorizin receptors in isolated kidney brush border membranes J Biol Chem 23 : 7779~7789, 1972
11. Hoæfer U, Groseclose R : The mechanism of Na-dependent D-glucose transport J Biol Chem 255 : 4435~4462, 1980
12. Hopfer U, Nelson K, Perrotto I, Isselbacher KJ : Glucose transport in isolated brush border membranes from rat small intestine J Biol Chem 248 : 25~32, 1973
13. Iwao S, Tsuchiya K, Sakurai H : Serum and urinary beta-2-microglobulin among cadmium-exposed workers J Occup Med 22 : 399~402 1980
14. Jorgensen PL, Skou JC : Purification and characterization of (Na⁺-K⁺)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney Biochim Biophys Acta 233 : 366~388, 1971
15. Kazantzis G : Some long-term effect of cadmium on the human kidney In : Cadmium 77 Proc 1st Int Cadmium Conf San Francisco, 1977, Metal Bulletin Ltd, London, 1978 pp 194~198
16. Kazantzis G, Flynn FV, Spowage JS, Trott DG : Renal tubular malfunction and pulmonary emphysema in cadmium pigment workers QJ Med 32 : 165~192, 1963
17. Kim YK, Choi JK, Kim JS, Park YS : Changes in renal function in cadmium-intoxicated rats Pharmacol Toxicol 63 : 342~350 1988
18. Kinne R, Schwartz : Isolated membrane vesicles in the evaluation of the nature, localization, and regulation of renal transport processes Kidney In-

- ternational 14 : 547~556, 1978
19. Kinsella JL, Holohan PD, Pessah NI, Ross CR : Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex *Biochim Biophys Acta* 552 : 468~477, 1979
20. Loeschke K, Baumann K : Kinetische studien der D-Glucoseresorption im proximalen konvolut der Ratteniere *Pflugers Arch* 305 : 139~154, 1969
21. Loeschke K, Baumann K : Kinetische studien der D-Glucoseresorption im proximalen konvolut der Ratteniere *Pflugers Arch* 305 : 139~154, 1969.
22. Lowry OH, Rosebrough ND, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with Fohn phenol reagent *J Biol Chem* 193 : 265~275, 1951
23. Molitoris BA, Kinne R : Ischemia induces surface membrane dysfunction mechanism of altered Na^+ -dependent transport. *J Clin Invest* 80 : 647~654, 1987.
24. Molitoris BA, Simon FR : Renal cortical brush-border and basolateral membranes : Cholesterol and phospholipid composition and relative turnover *J Memb Biol* 83 : 207~215, 1985
25. Murer H, Kinne R : The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes *J Memb Biol* 55 : 81~95 1980
26. Nomiyama K, Sato C, Yamamoto A : Early signs of cadmium intoxication in rabbits *Toxicol Appl Pharmacol* 24 : 625~635, 1973
27. Nomiyama K, Sugata Y, Yamamoto A, Nomiyama H : Effects of dietary cadmium on rabbits I Early signs of cadmium intoxication, *Toxicol Appl Pharmacol* 31 : 4~12, 1975
28. Nordberg GF, Monica N : Different binding forms of cadmium-Implications for distribution and toxicity. *J UOEH* (supplement) 0 : 153~164, 1987
29. Sachs G, Kinne R : Isolation and characterization of biological membranes In : *Membrane Physiology*, Eds : Andreoli TE, Hoffman JF, Fanestil DD Plenum Medical Book Company. New York, pp97~105
30. Scalera V, Huang YK, Hildermann B, Murer H : Simple isolation method for basolateral plasma membranes from rat kidney cortex *Membr Biochem* 4 : 49~61, 1981
31. Silverman M : Glucose reabsorption in the kidney *Can J Physiol Pharmacol* 59 : 209~224, 1981.
32. Tune BM, Burg MB : Glucose transport by proximal renal tubule *Am J Physiol* 221(2) : 580~589, 1971
33. Turner RJ, Moran A : Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule : evidence from vesicle studies *Am J Physiol* 242(Renal Fluid Electrolyte Physiol 11 : F406~F414, 1982
34. Turner RJ, Moran A : Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter *J Memb Biol* 67 : 73~80, 1982
35. Turner RJ, Silverman M : Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 2825~2829, 1977
36. Ullrich KJ : Sugar, amino acid, and Na^+

- cotransport in the proximal tubule
Ann Rev Physiol 41 : 181~195, 1979
37. Ullrich KJ, Rumnich G, Kloss S : Specificity and sodium dependence of the active sugar transport in the proximal convolution of the rat kidney
Pflugers Arch 351 : 35~48, 1974
38. You KS, Bae ES, Cha CW : The effect of combined treatment of cadmium and methionine on the accumulation of cadmium in liver and kidney and the activation of alkaline phosphatase in blood of mice Korean J Prevent Med 16 : 25~30, 1983
-