

카드뮴에 중독된 토끼의 신장 기저막소포에서 Succinate 이동에 대한 동력학적 연구

고신대학 의학부 생리학교실
김광휘, 박양생

Transport Kinetics of Succinate in Renal Basolateral Membrane Vesicles of Cadmium-Intoxicated Rabbits

Kwang Hwy Kim, Yang Saeng Park

*Department of Physiology
Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

Changes in transport kinetics of succinate were studied in renal basolateral membrane vesicles(BLMV) isolated from cadmium-intoxicated rabbits. Cadmium intoxication was induced by subcutaneous injections of CdCl_2 at a dose of $3\text{mg/kg} \cdot \text{day}$ over 3 weeks. Basolateral membrane vesicles were prepared from renal cortex by Percoll gradient centrifugation. Cadmium intoxication resulted in marked attenuation of Na^+ -dependent transport of succinate in basolateral membrane vesicles, and this was due to reduction in V_{max} and to increase in K_m .

These results indicate that cadmium intoxication impairs the Na^+ -succinate cotransport system in the basolateral membrane of renal proximal tubular cells.

Key Words : Cadmium, Kidney, Membrane Vesicles, Succinate

서 론

급격한 산업발달과 더불어 생성되는 각종 중금속부산물들은 직접, 간접으로 중요한 공해요인이 되고 있다. 대표적인 중금속 공해

물질의 하나로 카드뮴(Cd)을 들 수 있는데, 카드뮴 중독환자에서 볼 수 있는 가장 심각한 문제는 신장기능의 장애인 것으로 알려져 있다^{3,13)}.

신장에서 카드뮴 만성중독의 특징적인 변

화는 다뇨, 요농축능의 감소, 단백뇨, 아미노산뇨, 당뇨, 인산뇨, 칼슘뇨 등인데^{1,3,6,19}), 이러한 변화는 사구체보다 신세뇨관에 더 큰 영향이 미쳐진 결과로 알려져 있다²⁵). 이렇게 신세뇨관의 기능장애가 초래되는 이유는 카드뮴이 신장의 근위세뇨관 세포에 선택적으로 다량 축적되기 때문이다³²). 즉, 체내로 들어온 카드뮴은 간에서 metallothionein (MT)이라는 중금속 결합단백질의 합성을 유도하여 Cd-MT 복합체를 형성한다. 이 복합체는 사구체를 통하여 여과되어 pinocytosis에 의해 근위세뇨관 세포에 축적되고 여기서 lysosome효소에 의해 분해된다. 따라서 이때 유리된 카드뮴이온이 신세뇨관의 기능장애를 유발하는 것으로 보고되어 왔다^{29,32}).

근위세뇨관은 사구체에서 여과된 각종 영양물질(포도당, 아미노산 등) 및 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , succinate등 용질의 대부분을 재흡수하는 곳으로서, 이들 물질의 능동적 재흡수를 위한 에너지 공급은 Krebs cycle을 이용한 유기성 대사과정을 통해 이루어지고 있으며^{7,10,11,14,24,27,28,36}), 근위세뇨관의 brush-border membrane 및 basolateral membrane에는 여러가지 Krebs cycle 중간대사산물의 운반체가 존재하는 것으로 알려져 있고^{10,36}), 이들 Krebs cycle 중간대사산물(succinate, citrate, malate 등)은 Na^+ 과의 cotransport과정을 통하여 이동되는 것으로 알려져 있다. 그러나 카드뮴 중독 시 이러한 cotransport

과정이 어떻게 변화되는지에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 카드뮴에 중독된 토끼의 신장에서 분리한 기저막소포(basolateral membrane vesicle, BLMV)를 이용하여 succinate 이동과정을 연구함으로써 카드뮴중독 시 Krebs cycle 중간대사산물의 이동이 어떻게 변화하는지를 밝히고자 하였다.

실험재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 본 교실에서 계속 일정한 환경조건에서 사육한 New Zealand White 토끼수컷(2~3kg)을 사용하였는데, 실험동물들을 실험군과 대조군으로 나누어 실험군에는 매일 체중 kg당 3mg의 카드뮴을 CdCl_2 형태로 3주 이상 피하주사하여 카드뮴 중독을 유발하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다.

2) 요 분석

실험기간 중 각 군의 신장기능의 변화를 조사하기 위하여 약물처리 전일과 처리 후 일정한 간격으로 실험동물을 대사상자(metabolic cage)에 넣고 24시간뇨를 채취하였는데, 요채취 중 요중에 이물질이 혼입되는 것을 막기 위하여 24시간 동안 사료와 물을 주지 않았으며 요수집 용기에는 파라핀유를 점적하여 요의 증발을 막았다. 요채취가 끝나면 요량을 측정하고 요중의 포도당 함량을 mutarotase-GOD 방법 (Wako Technical Bulletin No. 270-66509)으로 측정하여, 동물들이 뚜렷한 당뇨를 보이면 카드뮴에 중독된 것으로 간주하여, 막소포분리에 사용하였다.

3) 기저막소포의 분리

막소포의 분리는 실험군과 대조군에서 동시에 시행하여 실험조건에 따라 나타날 수 있는 오차를 최소화하였다. 실험동물을 경부 탈골로 희생시켰으며 개복한 후 양쪽 신동맥으로부터 140mM NaCl, 10mM KCl, 1.5 mM CaCl_2 , Tris HCl(pH 7.4)이 포함된 차가운 용액(4°C)을 주입하여 신장내의 혈액을 재빨리 제거시켰다. 다음, 신장을 적출하여 피막을 벗기고 2~3mm 두께로 잘라 신피질만을 분리한 후 잘게 썰어서 sucrose 완충용액(250mM sucrose, 10mM triethanolamine, pH 7.4)내에 1/10(w/v)의 비율로 넣고 조직파쇄기(Potter homogenizer, clearance 0.15mm)를 이용하여 1,800rpm에서 20회 왕복하여 homogenate를 만들었다. Homogenate로부터 막소포의 분리는 Kinsella등²¹)과

Scalera 등³¹⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 즉, homogenate를 냉동원심분리기(Sorvall RC-5B, superspeed centrifuge, SS-34 Rotor)내에서 1,070xg로 10분간 원심분리한 후 상층액만을 취하여(Fraction 1), 이를 다시 14,460xg로 15분간 원심분리한 후 상층액과 pellet 상부의 fluffy layer를 취하여(fraction 2), homogenizer로 10회 왕복하여 균등질을 만들고 다시 47,800xg에서 30분간 원심분리하였다. 이것의 상층액과 하부의 검은 pellet는 버리고 연한 회색의 fluffy layer만을 취하여(fraction 3) homogenizer 내에 넣고 sucrose 완충용액을 첨가하여 균등액을 만들고 용량이 26.5ml 되게 조정한 후 Percoll 3.5ml를 첨가하여 총량이 30ml, Percoll 농도가 11.7% 되게 하고 잘 혼합한 다음, 47,800xg에서 40분간 원심분리하여 Percoll의 density gradient가 생기게 하였다. 피펫을 사용하여 상층으로부터 처음 5ml은 버리고 중간 6~13ml를 기저막소포(basolateral membrane vesicle, BLMV)분획으로 하였다. 이렇게 얻은 BLMV는 초원심분리기(Sorvall OTD, TFT 70.38)를 이용하여 100,000xg에서 60분간 원심분리하여 가장 하부에 침전된 투명한 Percoll층을 제거하였다. BLMV분획은 100mM mannitol, 100mM KCl, 10mM Hepes-Tris(pH 7.4)가 포함된 완충용액으로 단백질 농도가 6~7mg/ml되도록 희석하고 25gauge 주사침을 수회 통과시켜 막소포가 용액내에 고르게 분포되도록 하고, 37°C에서 30분간 preincubation한 후 사용시까지 -70°C에서 보관하였는데 분리 후 수일 이내에 사용하였다.

4) 표지효소(marker enzyme)의 활성도 측정

BBM과 BLM이 순수하게 분리되었는지의 여부를 평가하기 위하여 각 막의 marker enzyme인 alkaline phosphatase와 Na-K-ATPase 활성도를 각각 측정하였는데, Na-K-ATPase 활성도는 Jørgensen과 Skou의 방법¹⁷⁾으로 측정하였다. 즉 0.25mg의 막단백질을 포함하는 막소포분획을 2mM EDTA, 25mM

imidazole 및 0.6mg/ml의 deoxycholate(pH 7.0)가 포함된 용액에 가하고 총량이 1ml되도록 증류수를 넣은 후 25°C에서 30분간 preincubation시켰다. Preincubation이 끝난 후 혼합액을 100μl씩 취하여 histidine, NaCl 및 KCl이 포함된 용액(total ATPase 활성도 측정용)과 histidine, NaCl 및 ouabain이 포함된 용액(Mg-ATPase 활성도 측정용)이 각각 500μl씩 담긴 시험관에 가한후 ATP와 MgCl₂가 포함된 용액을 각각 500μl씩 첨가함으로써 효소반응을 개시하였다. 이때 반응액중의 Na⁺, K⁺, histidine, Mg⁺⁺, ATP 및 ouabain의 농도는 각각 130, 20, 30, 3, 3 및 1mM이었고 pH는 7.5이었으며 incubation 온도는 37°C였다. 10분간 preincubation한 후 6% perchloric acid 200μl를 가하여 반응을 중지시키고 시료를 얼음물 속에 보관하였다가 3,500xg로 15분간 원심분리한 후 상등액 내에 유리된 succinate의 양을 Fiske와 SubbaRow의 방법¹²⁾으로 측정하였다. Na-K-ATPase 활성도는 총 ATPase 활성도에서 Mg-ATPase 활성도를 감한 값으로 하였다.

Alkaline phosphatase의 활성도는 Kind-King의 방법(Wako Technical Bulletin No. 270-04609 for Serum Alkaline Phosphatase, Japan)에 의거 다음과 같이 측정하였다. 즉, 적절히 희석된 시료 50μl를 phenyl phosphate가 95mg/dl, 4-aminoantipyrine이 110mg/dl의 농도로 각각 포함되어 있는 0.05M carbonate 완충용액(pH 10.0) 2ml에 가하여 37°C에서 15분간 incubation 한 후 발색시약(0.05M phosphate 완충용액에 potassium ferricyanide가 2g/dl의 농도로 포함된 용액)을 2.0ml 첨가하여 반응을 중지시키고 발색될 때까지 수분간 기다렸다가 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준시약으로는 50mg/dl의 phenol을 사용하였다.

막소포분획의 단백질 농도는 Bio-Rad 시약을 사용하여 Bradford 방법⁸⁾으로 측정하였는데 표준단백질로 소혈청 알부민을 사용하였다.

5) 기저막소포에서 기질 이동의 측정방법

막소포내로의 기질 이동은 급속여과법¹⁵⁾을 변형시킨 방법으로 측정하였다. 즉, 막소포(4~6mg protein/ml) 일정량을 9배 용량의 방사성동위원소로 label된 기질(^{14}C -succinate 또는 ^{14}C -citrate)을 포함하는 incubation 용액(100mM NaCl, 100mM mannitol, 10mM Hepes-Tris, pH 7.4) 또는 vesicle 용액(incubation 용액의 100mM NaCl이 100mM KCl로 대체된 용액)과 혼합하여 반응시킨 후 적절한 시간간격으로 100 μl 씩 취하여 진공펌프가 연결된 filter를 통하여 급속히 여과시켰다. 다음 차가운 5ml의 정지용액(100mM mannitol, 100mM NaCl, 10mM Hepes-Tris, pH 7.4)으로 filter를 세척한 후 scintillation vial에 넣고 Lumagel(Lumac, AC Landgraaf, the Netherlands) 6ml을 첨가한 후 liquid scintillation counter(Packard Tri-Carb 4530)로 ^{14}C 의 방사능을 측정하였다. 사용된 Millipore filter는 HAWP(pore size 0.45 μm)로서 실험 하루전에 증류수에 담가 두었다가 사용하였다. 막을 통한 기질의 이동량은 막표면에 비특이적으로 결합된 ^{14}C 의 양, 즉 위 incubation 용액에 최종농도가 0.1% 되도록 deoxycholate를 첨가하여 막소포를 분해한 후 측정된 양을 교정한 후 nmoles/mg protein으로 나타내었다.

6) 사용된 시약

^{14}C -succinate 및 ^{14}C -citrate는 Amersham International(Amersham, UK)로부터, Percoll은 Pharmacia Fine Chemical(Uppsala, Sweden)으로부터, alkaline phosphatase 측정용 시약은 Wako사(Osaka, Japan)로부터, ouabain, ATP, 소혈청 알부민, Tris base 및 HEPES 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA)로부터 구입하였다.

7) 통계학적 분석

모든 실험결과는 평균값 $\pm$ 표준오차로 표기하였다.

결 과

그림 1은 정상토끼의 신장으로부터 분리한 외측피질과 외측수질 BLMV에서 100mM의 Na^+ 농도경사(막소포외액>막소포내액) 존재시와 Na^+ 부재시 succinate 축적과정의 시간적 변화를 보여준다. 이 실험에서 incubation 용액내에 K^+ ionopore인 valinomycin을 2 μM 포함시켰는데 이는 Na^+ -succinate cotransport가 electrogenic process일 경우를 대비하여 전기적인 저해작용을 배제하기 위함이었다. Na^+ 농도경사 존재시 외측피질이나 외측수질의 BLMV 모두에서 incubation 초기에 succinate의 축적량이 급격히 증가하여 약 30초후에는 최대로 축적되고 그 이후로는 막소포내에 축적되었던 succinate가 막소포 밖으로 빠져나가 1시간 후에는 평형상태에 도달하였다. Incubation 30초 때의 succinate 축적량은 평형상태에 비해 약 20배 이상이 되었는데, 이는 succinate가 농도차에 역행하여 이동하였음을 나타낸다. 이처럼 incubation 초기에 일시적으로 평형상태보다 높게 막소포내로 물질이 축적되는 현상을 "overshoot"이라고 하는데 이러한 현상은 Na^+ 과 cotransport 과정으로 이동되는 물질에서 볼 수 있는 공통적인 현상이다^{2,35)}. 한편 Na^+ 부재시 succinate 축적량은 외측피질과 외측수질 BLMV에서 모두 처음 30초 동안에 증가하여 평형상태에 이르렀으며 어느시간이나 양군간에 차가 없었다. 이러한 사실은 신세뇨관의 기저막에는 Na^+ -succinate cotransport system이 존재하며, 이 system은 세뇨관의 기시부나 말단부의 기저막에서 이동능력 및 기질친화력이 동일함을 나타낸다. 따라서 succinate이동에 미치는 카드뮴의 효과를 평가하는 이후의 실험에서는 신피질을 외측피질 및 외측수질로 구별하지 않고 혼합하여 사용하였다.

그림 2와 3은 대조군과 카드뮴군의 BLMV에서 succinate와 citrate의 축적량을 각각 보여준다. 대조군에서는 그림 1의 경우와 마찬가지로, 두 물질 모두에서 Na^+ 존재시 overshoot 현상을 보였다. 한편 카드뮴군

의 BLMV에서는 초기축적량이 succinate와 citrate 모두 각각 대조군의 1/3과 1/2 정도로 감소되었을 뿐만 아니라 overshoot현상도

현저히 억제되었다. 이와 같은 결과는 카드뮴 중독에 의해 신세뇨관의 기저막에 존재하는 Na^+ -cotransport 과정이 심하게 손상되

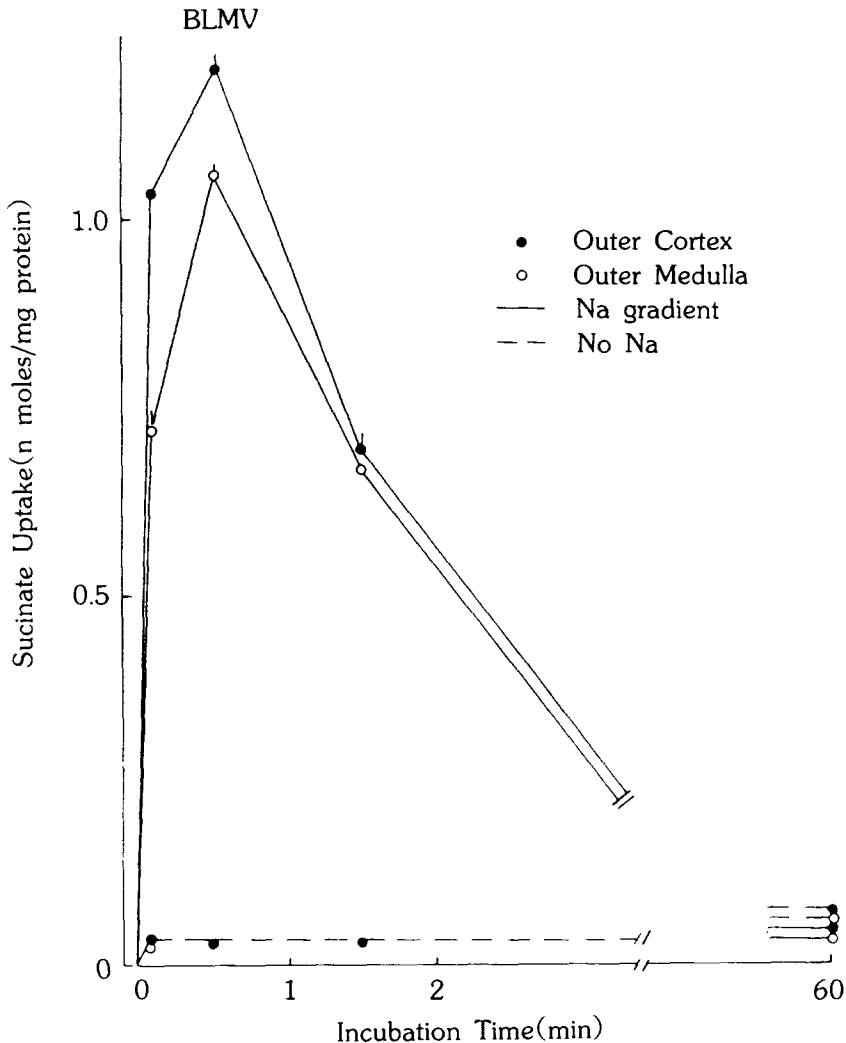


Fig. 1. Comparison of Na^+ -dependent and Na^+ -independent succinate uptakes by renal outer cortical and outer medullary BLMV of control rabbits. Vesicles containing 100mM mannitol, 100mM KCl and 20mM Hepes-Tris(pH 7.4) were incubated in a medium containing $5\mu\text{M}$ ^{14}C -succinate, 100 mM mannitol, 100mM NaCl(or KCl in the case of Na^+ -independent uptake), 20mM Hepes-Tris(pH 7.4) and $2\mu\text{M}$ valinomycin at 25°C . Values are mean $\pm$ SE of 3 determinations.

있음을 시사한다. 그러나 incubation 용액내에 Na^+ 이 없을 때는 시간이 지날수록 점차 증가하여 1시간 후에는 평형상태에 이르렀

으며 어느 시간에나 양군간에 차가 없었다. 이러한 사실은 Na^+ 과 무관한 succinate 및 citrate의 이동은 카드뮴 중독 시 변화되지

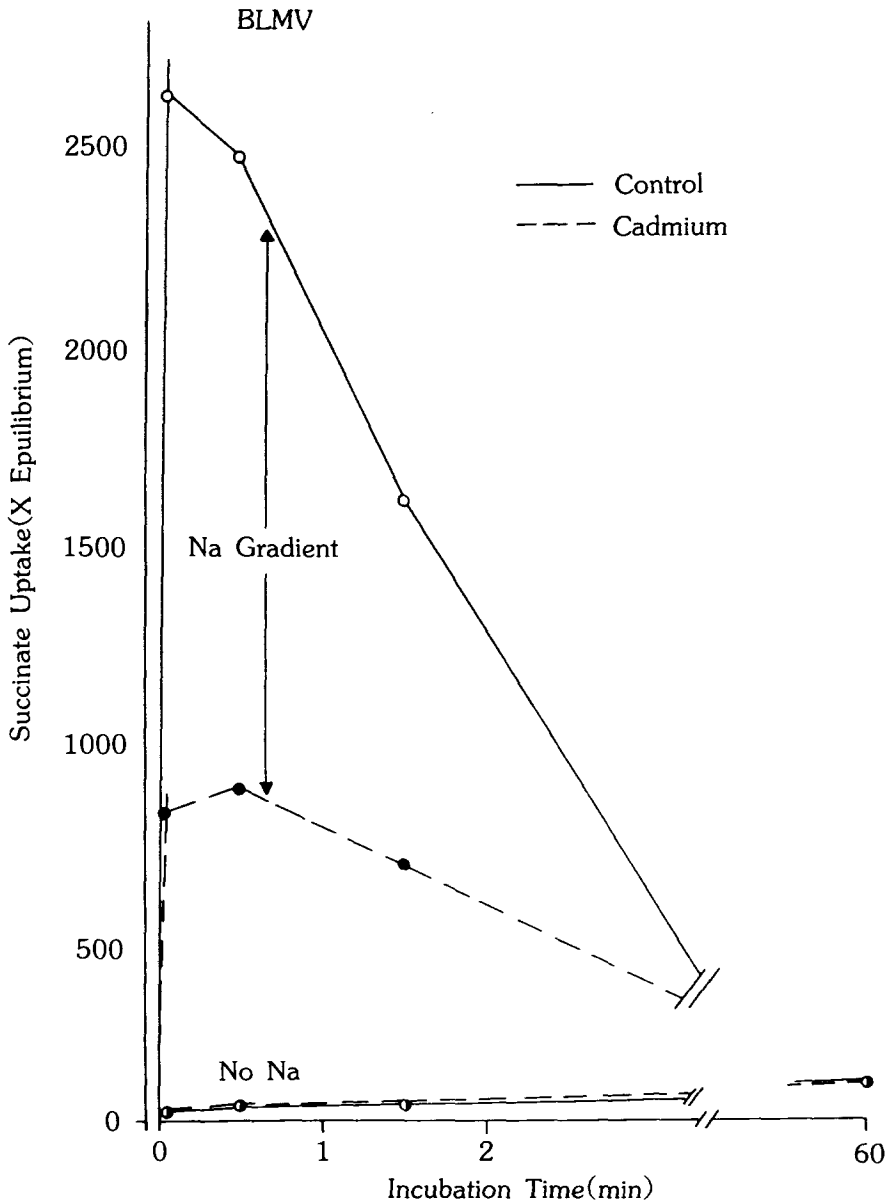


Fig. 2. Time courses of Na^+ -dependent and Na^+ -independent succinate uptakes by renal cortical BLMV of control and cadmium-treated rabbits. Conditions of incubation are the same as described in Fig. 1. Values are mean $\pm$ SE of 3 determinations.

않음을 나타낸다.

그림 4와 5는 Na^+ -succinate cotransport
과정이 카드뮴중독시 저해되는 기전을 규명

하기 위하여 BLMV의 Na^+ -dependent suc-
cinate 축적을 동력학적으로 분석한 것이다
그림 4는 처음 5초 동안에 축적되는 succi-

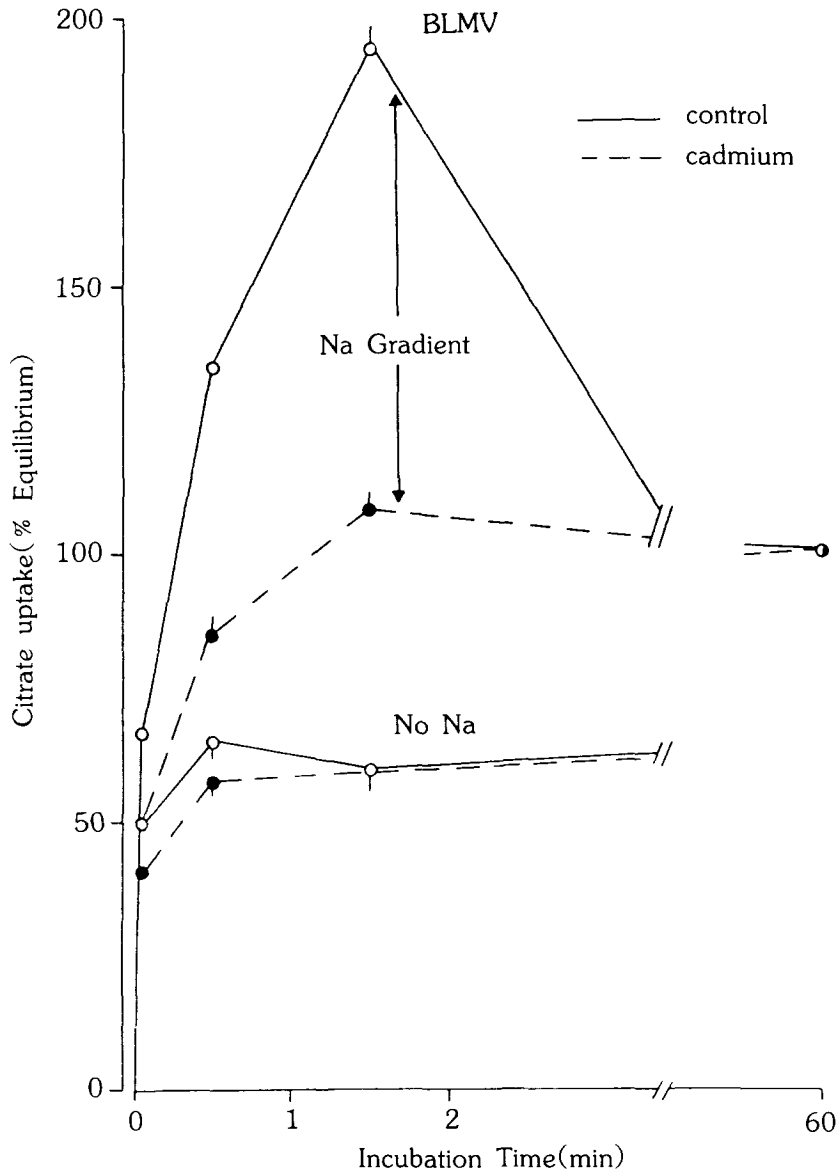


Fig. 3. Time courses of Na^+ -dependent and Na^+ -independent citrate uptakes by renal cortical BLMV of control and cadmium-treated rabbits. Conditions of incubation, other than the substrate ($20\mu\text{M}$ ^{14}C -citrate in this case), are the same as described in Fig. 1. Values are mean $\pm$ SE of 3 determinations.

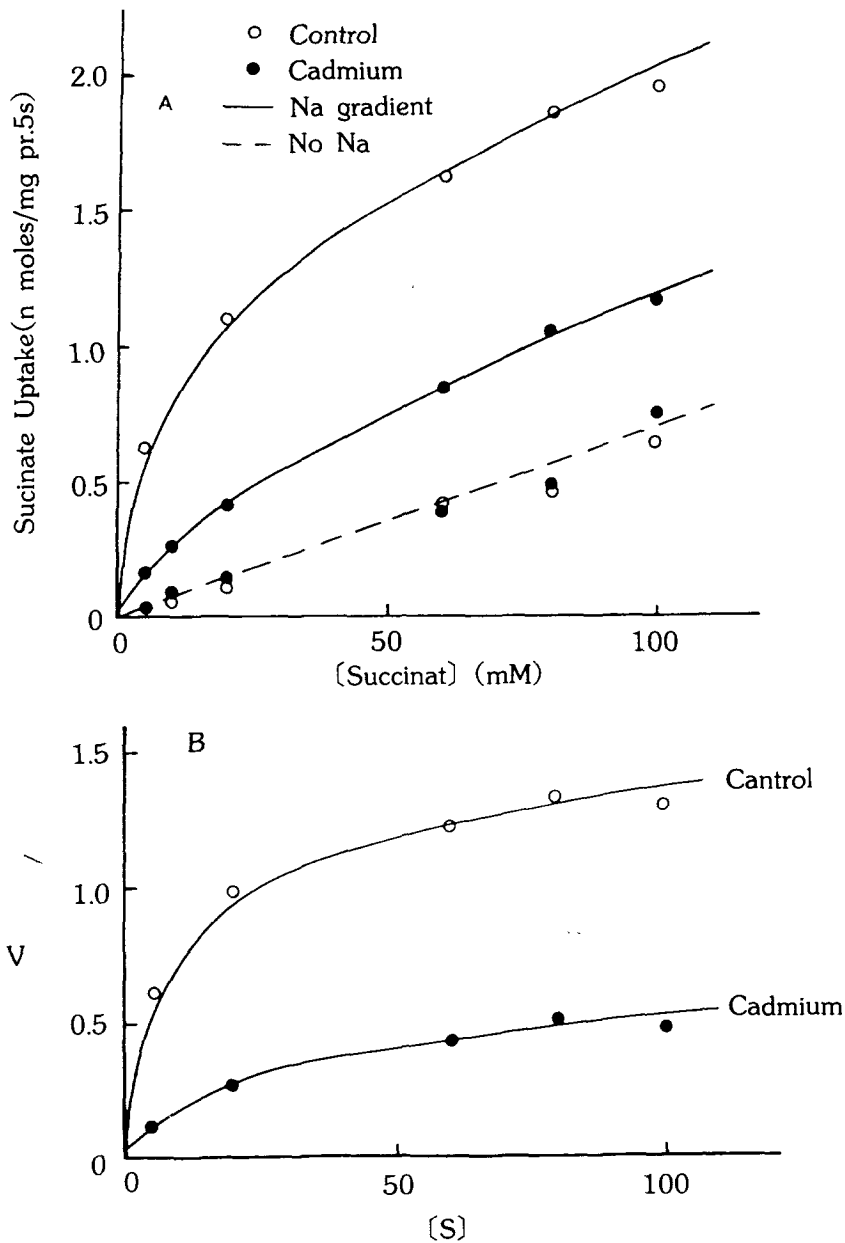


Fig. 4A. Initial (5sec) rates of Na⁺-dependent and Na⁺-independent succinate uptakes by renal cortical BLMV of control and cadmium-treated rabbits as a function of succinate concentration in the medium. Values are mean $\pm$ SE of 3 determinations.

B. Carrier-mediated components of Na⁺-dependent succinate uptakes.

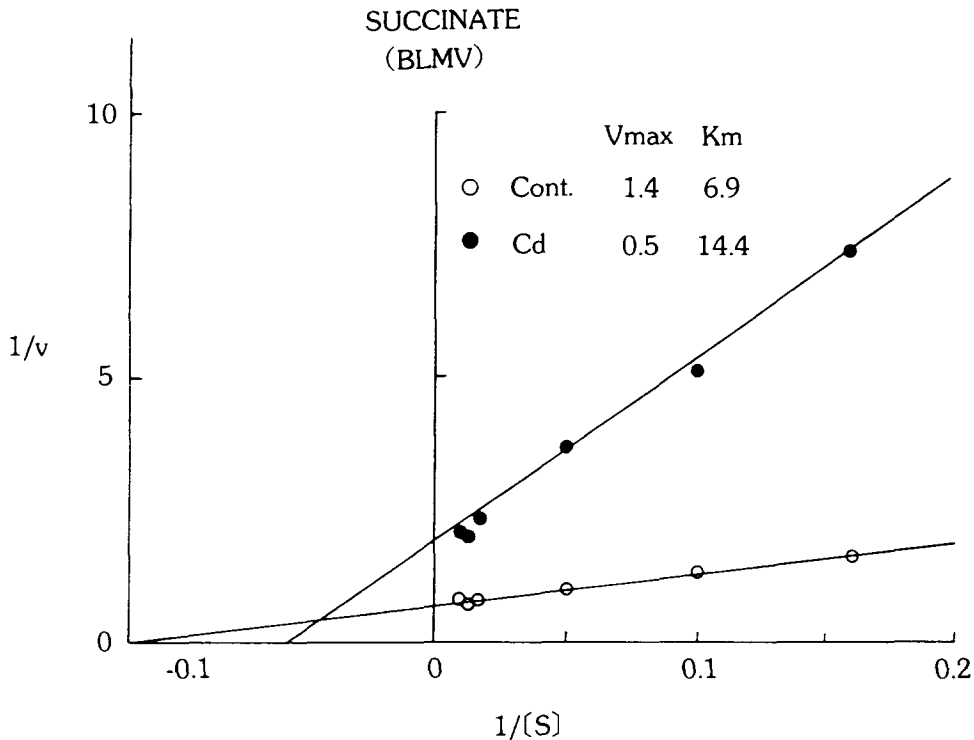


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of the carrier-mediated component of Na^+ -dependent succinate uptakes.

nate의 양(이를 초기이동률, initial velocity로 간주하였음)을 용액내의 succinate농도에 대한 함수로 나타낸 것이다. 100mM Na^+ 농도 경사 존재시, 이동률은 대조군과 카드뮴군 모두에서 succinate의 농도가 증가함에 따라 곡선적으로 증가하였으나 카드뮴군에서는 그 증가율이 대조군에 비해 낮았다(그림 4 A). 한편 Na^+ -independent 이동량은 succinate의 농도가 증가함에 따라 직선적으로 증가하였고, 그 기울기는 양군간에 동일하였다. 양군의 전체이동량으로부터 Na^+ -independent 이동량을 감하여 Na^+ -dependent 이동률을 산출한 후 (그림 4B), Lineweaver-Burk plot의 형태로 나타내었는데, 그림 5에서 보인바와 같이, 카드뮴군에서는 V_{max} 는 감소하고 K_m 은 증가하였다. 이러한 결과는 카드뮴중독 시 신세뇨관의 기저막에 존재하

는 succinate 운반체(Na^+ -succinate cotransporter)의 유효숫자 및 기질과의 친화력이 모두 감소됨을 나타낸다.

고 찰

Succinate, citrate 및 malate 같은 Krebs cycle 중간대사산물들은 근위세뇨관의 기저막에 존재하는 cotransport system들에 의해 이동된다^{9,16,18})고 알려져 있다. Lee 등²⁵)에 의하면 카드뮴에 중독된 쥐신장의 기저막소포에서는 Na^+ -dependent 이동이 크게 저해된다고 하였다. 카드뮴에 중독된 토끼에서의 succinate 및 citrate 이동을 연구한 본 연구에서도 이와 유사한 결과가 나타났다(그림 2와 3). 즉, 카드뮴을 처리한 토끼의 신피질에서 분리한 BLMV에서 Na^+ -dependent

succinate 이동량은 대조군에 비하여 현저히 감소하였으나, Na^+ 과 무관한 succinate 이동량은 변화가 없었다. 이는 카드뮴 처치에 의해 BLMV에 존재하는 Na^+ -succinate cotransport 기전이 심하게 저해 되었음을 시사한다.

이러한 저해 기전을 좀 더 상세히 분석하기 위하여 동력학적 분석(그림 5)을 시행한 결과 카드뮴에 의한 Na^+ -succinate cotransport의 저해는 $V_{\max}$ 의 감소와 K_m 의 증가로 인함을 알 수 있었다. 즉, 유효운반체의 숫적 감소 뿐만 아니라 운반체의 기질친화력도 감소한 것으로 생각되는데, 카드뮴이 어떠한 기전으로 이러한 결과를 초래하는지는 본 실험만으로는 알 수 없으며 앞으로의 연구 과제로 여겨진다.

본 연구에서 외측피질과 외측수질간의 succinate 이동은 overshoot의 크기와 시간에 따른 변화에 있어 별다른 차이를 보이지 않았다(그림 1). 이는 succinate 이동계의 특성이 근위세뇨관의 각 부위에 따라 변하지 않음을 나타내는데, 이는 BBMVB에서의 포도당이나 아미노산의 이동계와는 다른 점이다. Barfuss 및 Schafer^{4,5)}에 의하여 시행된 적출된 토끼 근위세뇨관 관류(isolated tubular perfusion)실험에 의하면 포도당과 아미노산(glycine)의 재흡수는 근위세뇨관 상부(early segment)에 존재하는 high capacity-low affinity system과 하부(late segment)에 존재하는 low capacity-high affinity system을 통해 일어나며, 이러한 이동계의 이질적인 분포는 포도당^{33,34)}, serine²³⁾, phenylalanine²²⁾, proline³⁰⁾, 및 alanine²⁶⁾에서 나타난다고 보고되어 있다. 이와같은 이동계의 분포는 Turner와 Moran³³⁾이 포도당 이동계에서 지적한대로, 여과된 용질의 효과적인 재흡수 기전을 제공할 것이다. 하지만 혈액으로부터의 물질의 이동(예, Krebs cycle 중간대사산물)은 세뇨관의 진행방향에 따라 운반체의 종류가 달리 분포될 필요가 없을 것으로 생각된다. 왜냐하면, 세뇨관주위 모세혈관(peritubula capillary)을 따라 기질의 농도는 큰 차이를 보이지 않기 때문이다. 하지만 세뇨관강막에 존재하는 Krebs cycle 중간대사물질 이동계는 포도당이나 아미노산 이동계에서와 같은 분포를 보일 가능성이 있는데, 이에 대해서는 추후 연구가 요구된다.

요 약

카드뮴이 신장에 존재하는 Krebs cycle 중간대사물 이동계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3주 이상 체중 kg당 3mg의 카드뮴을 토끼에게 매일 피하주사하여 카드뮴 중독을 유발하였다. 그 결과 뚜렷한 당뇨를 보인 토끼에서 분리한 기저막소포(BLMV)를 이용하여 succinate 이동을 조사한 결과 근위세뇨관 기저막의 Na^+ -dependent ^{14}C -succinate(또는 ^{14}C -citrate)이동이 심하게 저해되었는데, 동력학적 분석을 통하여 이는 $V_{\max}$ 치의 감소와 K_m 치 증가의 결과임을 알 수 있었다.

이러한 결과는 신장의 근위세뇨관 기저막에 존재하는 Na^+ -succinate cotransport system의 기능이 카드뮴 중독 시 저해되는 것은 유효 운반체의 숫적 감소 뿐만 아니라 운반체의 기질친화력이 감소되기 때문임을 나타낸다.

REFERENCES

1. Adams RG, Harrison JF, Scott P : The development of cadmium-intoxicated proteinuria, impaired renal function, and osteomalacia in alkaline battery workers. *Quat J 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, Dahlgren SE, Piscator M :

- Renal lesions in the rabbit after long-term exposure to cadmium. Arch Environ Health 17 : 24-28, 1968.
4. Barfuss DW, Schafer JA : Active amino acid absorption by proximal convoluted and proximal straight tubules. Am J Physiol 236 : F149-F162, 1979.
5. Barfuss DW, Schafer JA : Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron. Am J Physiol 241 : F322-F332, 1981.
6. Bernard A, Lauwerys R, Gengoux P : Characterization of the proteinuria induced by prolonged oral administration of cadmium in female rat. Toxicology 20 : 345-357, 1981.
7. Biber J : Cellular aspects of proximal tubular phosphate reabsorption. Kidney Int 36 : 360-369, 1989.
8. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72 : 248-254, 1976.
9. Burckhardt G : Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. Pflers Arch 401 : 254-261, 1984.
10. Burg MB : Renal handling of sodium, chloride, water, amino acids, and glucose. In : The Kidney(Eds : Brenner BM and Rector FC), WB Saunders, Philadelphia, 1986.
11. Dennis VW, Brazy PC : Divalent anion transport in isolated renal tubules. Kidney Internat 22 : 498-506, 1982.
12. Fiske CH, SubbaRow Y : The colorimetric determination of phosphate. J Biol Chem 66 : 375-400, 1925.
13. Flick DF, Kragbill MF, Dimitroff JM. Toxic effects of cadmium : A Review. Environ Res 4 : 71-85, 1971.
14. Gmaj P, Murer H : Cellular mechanisms of inorganic phosphate transport in kidney. Physiol Rev 66 : 38-70, 1986.
15. 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.
16. Jørgensen KE, Kragh-Hasen H, Roigaard-Peterson H, Sheikh MI : Citrate uptake by basolateral and luminal membrane vesicles from rabbit kidney cortex. Am J Physiol 244 : F686-F695, 1983.
17. Jørgensen PL, Skou JC : Purification and characterization of (Na⁺-K⁺)-AT-Pase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. Biochim Biophys Acta 233 : 366-388, 1971.
18. Kahn AM, Branham S, Weinman EJ : Mechanism of L-malate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. Am J Physiol 246 : F779-F784, 1984.
19. Kim YK, Choi JK, Kim JS, Park YS : Changes in renal function in cadmium-intoxicated rats. Pharmacol Toxicol 63 : 342-350, 1988.
20. Kim KR, Lee HY, Kim CK, Park YS : Alteration of renal amino acid transport system in cadmium-intoxicated Rats. Toxicol Appl Pharmacol 106 : 102-111, 1990.
21. 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.
22. Kragh-Hansen U, Roigaard-Peterson H.

- Jacobsen C, Sheikh MI : Tubular localization of Na^+ -dependent phenylalanine and glucose transport systems. *Biochem J* 220 : 15-24, 1984.
23. Kragh-Hansen U, Sheikh MI : Serine uptake by luminal and basolateral membrane vesicles from rabbit kidney. *J Physiol* 354 : 55-67, 1984.
24. Lassiter WE, Gottschalk CW, Mylle M : Micropuncture study of renal tubular reabsorption of cadmium in normal rodents. *Am Physiol* 204 : 771-775, 1963.
25. 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.
26. Lee HY, Kim KR, Park YS : Transport kinetics of glucose and alanine in renal brush-border membrane vesicles of cadmium-intoxicated rabbits. *Pharmacol Toxicol* 69, 1991.
27. Mizgala CL, Quamme GA : Renal handling of phosphate. *Physiol Rev* 65 : 431-466, 1985.
28. Ng RCK, Peraino RA, Suki WN : Divalent cation transport in isolated tubules. *Kidney Int* 22 : 492-497, 1982.
29. Nordberg GF, Monica N : Different binding forms of cadmium-implications for distribution and toxicity. *J UOEH* 9(supplement)153-164, 1987.
30. Roigaard-Peterson M, Sheikh MI : Renal transport of neutral amino acids. Demonstration of Na^+ -dependent electrogenic uptake of L-proline, hydroxy-L-proline by luminal membrane vesicles. *Biochem J* 220 : 25-33, 1984.
31. Scalera V, Huang YK, Hildermann B, Murer H : Simple isolation method for basolateral plasma membranes from rat kidney cortex. *Memb Biochem* 4 : 49-61, 1981.
32. Squibb KS, Ridlington JW, Carmichael NG, Fowler BA : Early cellular effects of circulating cadmium-thionein on kidney proximal tubules. *Environ Health Perspect* 28, 187-196, 1979.
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 : F406-F414, 1982.
34. Turner RJ, Moran A : Further studies of proximal tubular brush-border membrane. D-glucose transport heterogeneity. *J Memb Biol* 70 : 37-45, 1982.
35. Ullrich KJ : Sugar, amino acid, and Na^+ cotransport in the proximal tubule. *Ann Rev Physiol* 41 : 181-195, 1979.
36. Ullrich KJ : Renal transport of organic solute. In : *Membrane Transport in Biology* (Eds. Giebish G, Tosteson DC, and Ussing HH). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Vol IV A, 1983, pp413-448.