

신장근위곡세뇨관 소포를 이용한 신장독성
실험모델 개발
2. *Uranyl acetate*가 토끼 신장근위곡세뇨관 소포에서의
물질이동에 미치는 영향

이영재 · 이창엽 · 이문한 · 류관동 · 성하정 · 박종명* · 이재진* · 박근식*
서울대학교 수의과대학 · *농촌진흥청 가축위생연구소

**DEVELOPMENT OF A NOVEL EXPERIMENTAL MODEL FOR
NEPHROTOXICITY ASSESSMENT USING
MEMBRANE VESICLES OF
RABBIT RENAL PROXIMAL TUBULES
II. Effects of Uranyl acetate on Uptakes of
Some Substances across Membrane Vesicles of Rabbit
Renal Proximal Tubules**

Young Jae Lee, Chang Eop Lee, Mun Han Lee, Pan Dong Ryu, Ha Jung Sung,
Jong Myeong Park*, Jae Chin Rhee* and Keun Sik Park*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744

*Veterinary Research Institute, Rural Development Administration, Anyang 430-016

(Received June 9, 1992)

(Accepted July 2, 1992)

ABSTRACT: Basolateral and brush border membrane (BLM and BBM) vesicles of renal proximal tubules were prepared from adult male New Zealand White rabbits to develop an experimental model for assessment of nephrotoxicity. PAH uptakes using BLMV, and glucose and leucine uptakes using BBMV were measured in the rabbits treated uranyl acetate. In addition, urinalysis and histopathological studies were performed to investigate the relationship with the membrane vesicle uptakes. The activity of Na^+ , K^+ -ATPase was enriched 12.3-fold in basolateral membrane vesicles (BLMV), and the specific activity of alkaline phosphatase in purified brush border membrane vesicles (BBMV) was enriched 10.1-fold compared with each of microsomal homogenate. In the uptake experiments, uranyl acetate increased initial and probenecid-sensitive PAH uptakes in

BLMV, however, uranyl acetate decreased uptakes of glucose and leucine in BBMV, and also decreased phlorizin-sensitive glucose and Na⁺-dependent leucine uptakes in BBMV. Uranyl acetate significantly increased the serum creatinine, serum urea nitrogen (BUN) and urinary excretion of glucose. Uranyl acetate caused moderate necrotic changes in renal tubular cells and formation of urinary cast in the lumina of Henle' loop and collecting tubules besides the swelling of renal tubules.

Key words: *Uranyl Acetate Nephrotoxicity, Basolateral Membrane Vesicles, Brush Border Membrane Vesicles, PAH, Glucose, Leucine.*

서 론

대부분의 약물이나 독성물질이 체내에서 대사되어 배설될 때에는 능동적 또는 수동적 방법으로 신장을 통하여 배설되므로 신장독성을 일으킬 기회가 많을 것이며, 또한 영양물질이나 그 중간 대사산물은 신사구체를 통하여 일단 여과 되었다가 근위곡세뇨관에서 능동적으로 재흡수되기 때문에 신장독성은 생체기능을 유지하는데 위협적인 요인으로 작용하고 있다.

지금까지 신장기능을 측정하는 방법으로는 각종 물질의 청소율시험(clearance test), 요분석, 오줌 및 혈액의 효소활성치 측정 그리고 병리조직학적 방법이 사용되고 있다(Offerman 등, 1986; Goren 등, 1986; Kelsen 등, 1985). 그러나 이러한 방법으로는 정확한 중독기전을 구명하기에 미흡하고, 약·독물에 따라서는 투여용량과 투여기간에 따라 그 결과가 다르게 나타날 수도 있다(Pariat 등, 1988).

한편 신장을 통한 물질의 재흡수 또는 배설기전을 연구하는데 신피질절편법(renal cortex slice), 미세천자법(micropuncture technique) 그리고 세포배양법 등의 기법이 개발되어 사용되고 있다(Gandolfi와 Brendel, 1990). 그러나 이들 실험기법중 세포배양법은 실험 도중 세포연 특이효소(brush border enzyme)와 glucogenetic activity가 소실되는 등 여러가지 문제점이 있으며, 미세천자법은 nephron의 특정부위를 얻기가 힘들 뿐만 아니라 nephron의 극히 일부분에 국한된 결과만을 얻을 수 있으며, 신피질편을 사용하는 경우에도 절편 자체의 두께(0.5 mm) 때문에 물질에 따라 확산거리를 고려하여야 하며 또한 균질한 세포층을 얻기가 어렵고, 포도당 등 이동되는 물질 자체가 대사되어 물질이동과 연관된 독성기전을 구명하는데 어려운 점이 많다(Tyson 등, 1990).

최근에는 신장 근위곡세뇨관의 세포연(brush border membrane, BBM)과 기저측막(basolateral membrane, BLM)의 vesicle조제방법이 확립되어 이들 물질의 막을 통한 이동기전을 구명하는데 크게 기여하였다(Kinne 등 1975). 즉 과거의 기법을 통하여 물질이동을 조사하였을때, 세포연과 기저측막 중 어느 곳을 통하여 이동되는지 혹은 운반단백계의 소재가 어디인지 알 수가 없었으나 이 기법이 개발됨에 따라, para-aminohippurate(PAH)를 비롯한 유기음이온(Kinsella 등, 1979b)은 기저측막을 통하여, 포도당(Ella 등, 1977), 아미노산(Ulrich 등, 1984) 그리고 tetraethylammonium (TEA) 등의 유기양이온(Holohan과 Ross, 1980)은 세포연을 통하여 재흡수 또는 분비됨이 밝혀졌다.

본 실험에서는 신장독성이 있는 것으로 알려져 있는 약·독물을 토끼에 일정기간 투여하여 신장손상을 유도한 다음 BLM과 BBM vesicle을 만들어 유기음이온, 포도당 및 leucine 등의 물질이동을 측정함으로써 신장독성 실험모델을 개발하는데 그 목적이 있다. 따라서 이 연구에서는 vesicle조제기법을 사용하여 uranyl acetate가 유기음이온, 아미노산 및 포도당의 막이동에 미치는 영향, 즉 uranyl acetate가 어떠한 기전에 의하여 신장독성을 유발하는지를 조사하고 이들 결과와 뇨중의 신장유래 특이효소의 활성 및 병리조직학적 변화를 비교함으로써 renal membrane vesicle uptake실험의 독성실험모델로서의 효용성을 입증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 2-3 kg의 성숙한 New Zealand White 수토끼 32마리를 사용하였다. 약물투여군 및 무처치대조군에 각 16마리씩 배치하고 각 12마리는 vesicle uptake 실험에, 각 4마리는 병리조직학적 검사에 사용하였다. 사료(토끼용 펠렛사료, 신촌사료)와 물은 자유로이 급식 시키면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

약물투여

실험군은 uranyl acetate(Merck, 0.22 mg/kg body wt/day)를 7일간 피하로 주사하였다.

신장 근위곡세뇨관 막소포를 이용한 물질이동 측정

1) 막소포의 제조

신장 근위곡세뇨관의 세모연(brush border membrane, BBM)과 기저측막(basolateral membrane, BLM)의 소포는 분별원심분리법(Kinsella 등, 1979a)과 Percoll 밀도경사 원심분리법(Scalera 등, 1980)을 병용하여 제조하였다.

2) 표지효소 활성도 측정

BLM의 표지효소인 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성도는 Jorgenson과 Skou의 방법(1971)에 따라 측정하였고, Na^+ , K^+ -ATPase의 활성도는 $\mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$ 로 나타내었다.

Alkaline phosphatase의 활성도는 Wako사(Japan)의 serum alkaline phosphatase kit를 사용하여 측정하였으며 그 활성도는 King Armstrong unit(KA unit)로 나타내었다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 Bradford의 방법(1976)에 준하여 측정하였다.

3) 물질이동 측정

BLMV에 대하여는 유기음이온(para-aminohippurate, PAH)의 uptake을, BBMV에 대하여는 leucine 및 포도당의 uptake을 실시하였다. 모든 uptake 실험은 rapid filtration method(이 등, 1992; Berner와 Kinne, 1976)에 준하여 실시하였다.

4) 임상화학 및 병리조직학적 검사

(1) 임상화학적 검사

토끼를 대사 cage에 넣어 사육하면서 약물투여 개시전 및 투여기간 동안 매일 오전 8시에 24시간 뇨를 채취하여 뇨량, 뇨삼투압, 뇨단백, 뇨당, creatinine 및 urea nitrogen치를 측정하였으며, 신장독성의 지표로 사용되는 γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP)와 leucine aminopeptidase(LAP)의 활성도를 측정하였다(Endou, 1987). 그리고 혈청을 분리하여 creatinine 및 blood urea nitrogen(BUN)치를 측정하였다.

(2) 병리조직학적 검사

최종 약물투여 후 24시간이 경과한 다음 투여군의 실험동물을 희생시켜 신장에서의 병리조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

신장 근위곡세뇨관 막소포의 물질이동에 미치는 영향

1) 표지효소 활성도

막소포가 순수하게 분리되었는지 확인하기 위하여 BLM과 BBM 각각의 표지 효소인 Na^+ , K^+ -ATPase와 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였다. Na^+ , K^+ -ATPase의 활성은 BLMV에서 $118.9 \mu\text{mole Pi/}$

protein/hr, BBMV에서 $14.03 \mu\text{mole}/\text{Pi}/\text{protein}/\text{hr}$ 로 microsomal homogenate의 $9.64 \mu\text{mole Pi}/\text{protein}/\text{hr}$ 에 비하여 각각 12.3배 및 1.46배 이었다. Alkaline phosphatase의 활성은 BLMV에서 162.6 KA units, BBMV에서 395.0 KA unit로, microsomal homogenate의 39.1 KA units에 비하여 각각 4.16배, 10.1배 이었다.

2) 막소포를 통한 물질이동

(1) PAH uptake

대조군 및 uranyl acetate 투여군에서 BLMV의 PAH uptake치를 Na^+ 및 α -ketoglutarate 농도 경사 하에서 incubation time에 따라 측정된 결과는 Fig. 1에서와 같다. 대조군에서 PAH uptake치는 60초에서 $137.8 \text{ pmole PAH}/\text{mg protein}/\text{hr}$ 이었고, 60분후에서 측정된 값은 $105.4 \text{ pmole PAH}/\text{mg protein}/\text{hr}$ 로 60초에서의 PAH uptake치가 평형상태(60분)에서의 uptake치의 1.3배이었으며, 2 mM probenecid에 의하여 PAH uptake가 억제되었다. 그리고 probenecid 감수성 PAH uptake치는 대조군의 경우 60초 및 60분에서 각각 59.1, $13.0 \text{ pmole PAH}/\text{mg protein}/\text{hr}$ 이었다(Fig. 4).

그러나 uranyl acetate 투여군에서 60초에 측정된 총 PAH uptake치는 대조군에 비하여 163.0%로 증

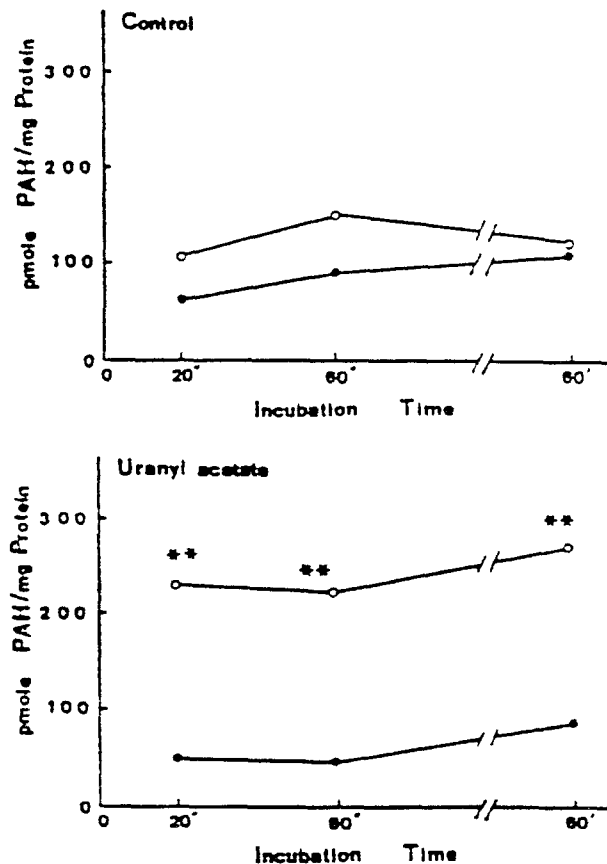


Figure 1. The time course of PAH uptake in renal cortical BLMV of control and uranyl acetate-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM α -ketoglutarate, then vesicular uptake of PAH was assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), $40 \mu\text{M}$ PAH, $3.6 \mu\text{Ci } ^3\text{H-PAH}/\text{ml}$ of medium, and either with (\bullet) or without (\circ) 2 mM probenecid.

가하였고($p < 0.01$), 60초에서의 probenecid 감수성 PAH uptake치는 대조군에 비하여 uranyl acetate 투여군은 294.2%로 증가되었다($p < 0.01$).

(2) 포도당 uptake

BBMV에서의 경시별 포도당 uptake치를 측정된 결과는 Fig. 2에서와 같다. 대조군에서 포도당 uptake치는 60초에서 389.5 pmole glucose/mg protein/hr이었고, 60분에서 95.6 pmole glucose/mg protein/hr로 60초에서의 포도당 uptake치가 평형상태 (60분)에서의 포도당 uptake치의 약 4.1배로 전형적인 "overshoot" 현상을 나타내었다. 이런 포도당 uptake의 overshoot 현상은 1 mM phlorizin에 의하여 억제되었는데, phlorizin 감수성 포도당 uptake치는 대조군의 경우 60초 및 60분에서 각각 324.5 및 9.0 pmole glucose/mg protein/hr이었다(Fig. 4).

그러나 uranyl acetate 투여군에서 60초에서 측정된 총 포도당 uptake치는 대조군의 29.4%로 감소되었고($p > 0.01$), 이때 60초에서의 phlorizin 감수성 포도당 uptake치는 대조군의 4.1%로 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$).

(3) Leucine uptake

BBMV에서의 경시별 leucine uptake치를 측정된 결과는 Fig. 3에서와 같다. 대조군에서 총 leucine

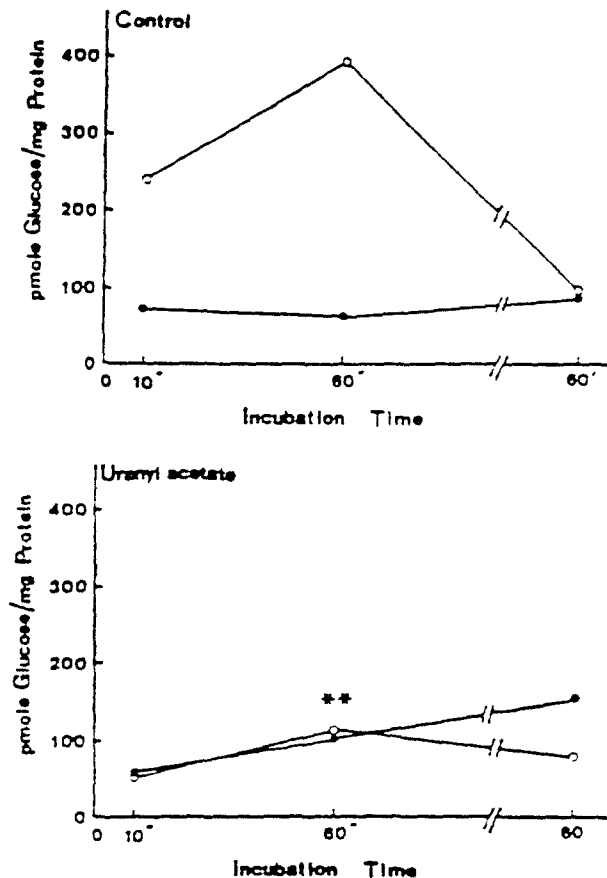


Figure 2. The time course of glucose uptake in renal cortical BBMVs of control and uranyl acetate-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl and 20 mM HEPES (pH 7.4). Intravesicular content of glucose was assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 μ M glucose, 3.6 μ Ci 3 H-glucose/ml of medium, and either with (●) or without (○) 1 mM phlorizin. **: $p < 0.01$.

uptake치는 60초에서 110.0 pmole leucine/mg protein/hr이었고, 60분에서는 34.3 pmole leucine/mg protein/hr이었다. 즉, 60초에서 측정된 leucine uptake치는 평형상태에서의 leucine uptake치의 3.2배로 Na^+ -dependent leucine uptake의 전형적인 "overshoot" 현상이 관찰되었다. 그리고 Na^+ -dependent leucine uptake치는 대조군의 경우 60초에서 52.4 pmole leucine/mg protein/hr이었다(Fig. 4).

그러나 uranyl acetate 투여군에서 60초에서의 총 leucine uptake치는 대조군의 20.2%로 감소되었고 ($p < 0.05$), 이때 uranyl acetate 투여군에서의 Na^+ -dependent leucine uptake치도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

임상화학 및 병리조직학적 소견

1) 임상화학적 소견

Uranyl acetate의 투여전 및 투여기간 동안 24시간 간격으로 뇨를 채취하여 뇨량, 뇨삼투압, 뇨단백, 뇨당, creatinine 및 urea nitrogen치와 γ -GTP, LAP의 활성을 측정하였다. 최종 약물 투여 후 24시간 동안 뇨를 채취하여 임상화학적 소견을 관찰한 결과, urea nitrogen과 creatinine의 뇨배설량 그리고 γ -GTP와

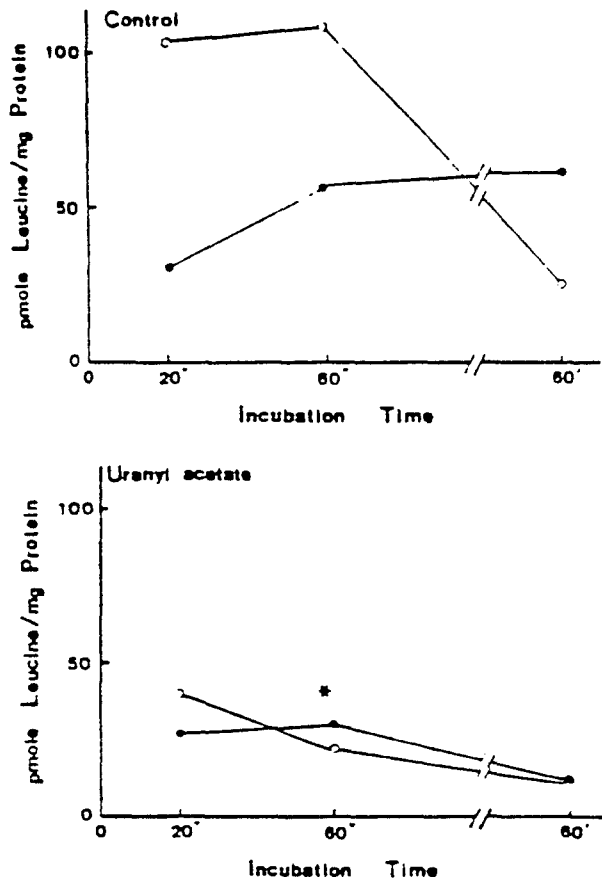


Figure 3. The time of course of Na^+ -dependent (-○-) and Na^+ -independent (-●-) leucine uptake in renal cortical BBMVs of control and uranyl acetate-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl and 20 mM HEPES (pH 7.4). Intravesicular content of leucine was then assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl (or KCl in the case of Na^+ -independent uptake), 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), 20 μ leucine, 3.2 μCi ^3H -leucine/ml of medium. *: $p < 0.05$.

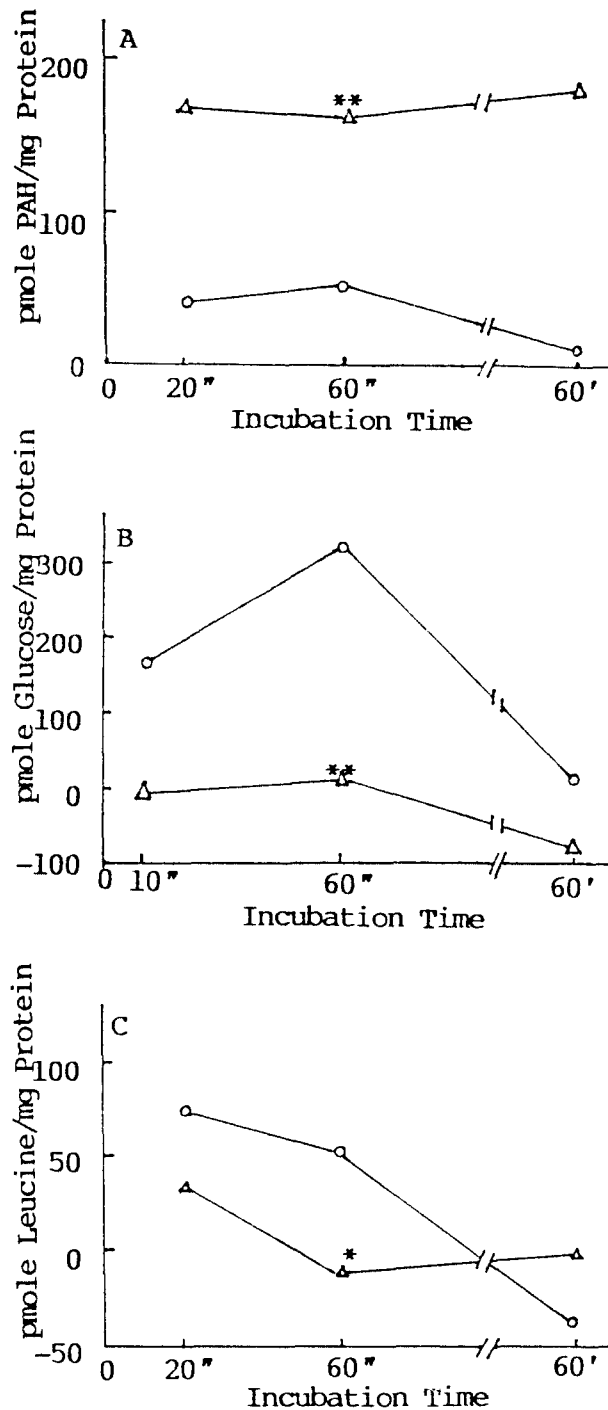


Figure 4. Effects of uranyl acetate on the probenecid-sensitive PAH (A), phlorizin-sensitive glucose (B) and Na^+ -dependent leucine (C) uptakes. Values are based on the data shown in Fig. 1, 2 and 3. ●: control, Δ: uranyl acetate. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

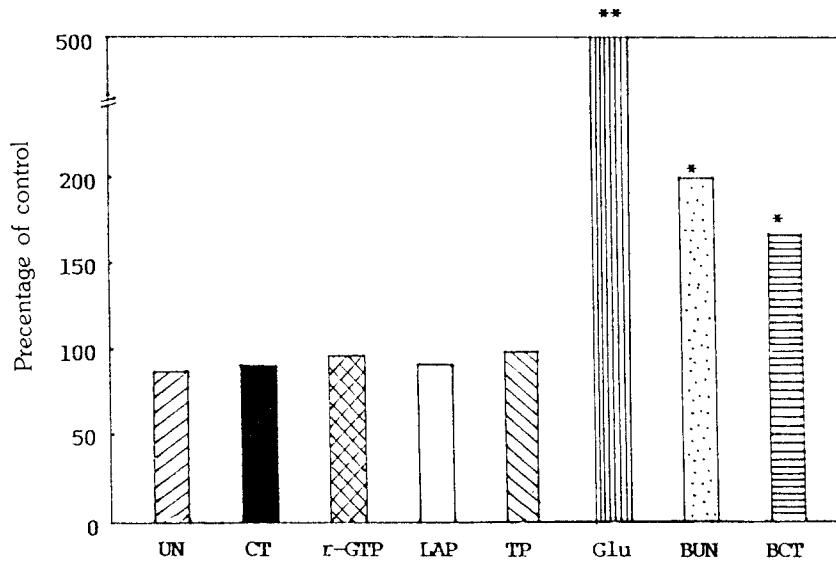


Figure 5. Influence of uranyl acetate on clinical chemistry parameters. UN; urinary urea nitrogen, CT: urinary creatinine, γ -GTP; gamma-glutamyl transpeptidase, LAP; leucine aminopeptidase, TP; urinary total proteins, Glu; urinary glucose, BUN; blood urea nitrogen, BCT; blood creatinine. Urine was collected during 24 hr after treatment of uranyl acetate (0.22 mg/kg body wt/day, s.c.) for 7 days. Values are expressed as percentage of control. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

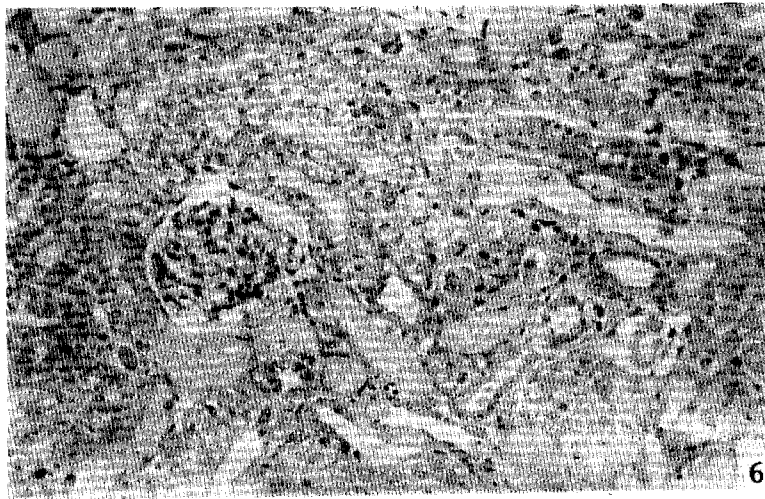


Figure 6. Necrotic changes of the proximal and distal convoluted tubules following 7 days of uranyl acetate treatment (0.22 mg/kg body weight/day, s.c.). H&E staining. $\times 200$.

LAP의 활성은 감소하는 경향이었으나 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 뇨중 포도당 배설량은 유의하게 증가하였고($p < 0.01$), 혈청에서의 BUN 및 creatinine치도 유의하게 증가되었다 ($p < 0.05$, Fig. 5).

2) 병리조직학적 소견

약물투여가 끝난 24시간 후에 uranyl acetate 투여군의 실험동물을 희생시켜 신장을 적출하여 병리조

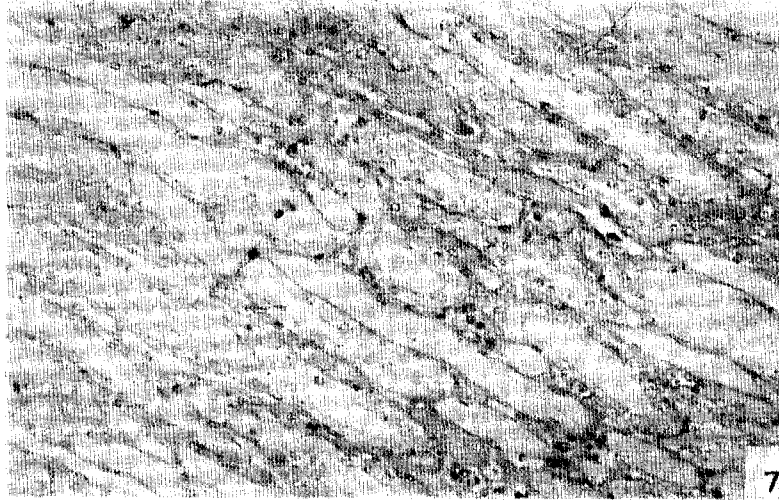


Figure 7. Formation of urine cast in the lumina of Henle's loop and collecting tubules following 7 days of uranyl acetate treatment (0.22 mg/kg body weight/day, s.c.). H&E staining. $\times 200$.

직학적 소견을 광학현미경으로 관찰한 결과 근위곡세뇨관 상피세포의 망상공포형성, 원위곡세뇨관 상피세포의 괴사, 탈락 및 붕괴(Fig. 6)와 Henle계제의 확장 및 요원주 형성이 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

지금까지 연구된 각종 신장독성물질의 경우, 대부분이 근위곡세뇨관의 퇴행성 변화와 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 신장독성물질에 의하여 신세뇨관이 형태학적 변화를 보이기 이전에 세포의 구성 성분 혹은 생리적 기능물질이 먼저 손상받을 것이며, 약 또는 독물에 따라서 신세뇨관의 BLM 및 BBM에 존재하는 유기음이온, 포도당 및 아미노산 운반계의 기능이 억제될 것으로 사료된다. 최근에는 신세뇨관의 막소포 제조방법이 확립되어 이들 물질의 막을 통한 이동 기전은 물론 세포이하의 수준에서 조직병변을 연구하는데 큰 기여를 하고 있다. 즉 BLM 및 BBM vesicle을 이용한 막이동 기전 연구 기법은 막소포 제조에 다소 시간이 걸리며, 서로 다른 세포의 오염 가능성을 배제할 수 없는 단점이 있으나, 막소포내에서는 대사과정이 일어나지 않으므로 특이적인 막이동 기전을 연구할 수 있고, 막소포 내외의 물질조성을 쉽게 조절할 수 있어 물질이동의 원동력(driving force)을 구명하는데 매우 유용하며, BLM과 BBM을 분리하여 실험할 수 있으므로 각각의 물질이동 특성을 연구할 수 있는 장점이 있다(Ross와 Holohan, 1983). 그러므로 본 연구에서는 세뇨관의 BLM 및 BBM 막소포를 이용한 신장독성 평가기법의 유용성을 입증하고자 하였다.

본 연구에서 BLM 및 BBM 막소포의 분리제조는 Percoll 밀도경사 원심분리법 및 2가 양이온 (Ca^{2+}) 침전법을 이용하였다. 대체로 BBM은 BLM에 비하여 단백질 함량이 높고 유동성이 작아 그 밀도가 크기 때문에 밀도경사 원심분리시 하단부에 위치하게 된다. 이렇게 분리한 BLM과 BBM은 초고속원심분리하여 Percoll을 제거하였고, BBM층에 양이온인 Ca^{2+} 을 가하여 더욱 정제된 막소포를 제조하였다. 본 실험에서 BLMV 및 BBM의 특이효소인 Na^+ , K^+ -ATPase와 alkaline phosphatase의 활성은 $118.9 \mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$, 395.0 KA units 로 microsomal homogenate에 비하여 각각 12.3배 및 10.1배의 높은 활성을 나타내었다. Microsomal homogenate에 대한 BLM의 Na^+ , K^+ -ATPase와 alkaline phosphatase의 각각 활성은 Scalera 등 (1981)과 Inui 등 (1981)의 Percoll 밀도경사법에 의한 BLM 및 BBM 정제법에서는 각각 3.5배와 5.9배, 3.1배와 7.4배이었으며, Kinsella 등(1979a)과 Mollitoris와 Simon (1985)의 sucrose gradient/divalent cation precipitation을 이용한 방법에서는 각각 24배와 19.1배, 7.2배와 13.7배이었고,

Mollitoris와 Simon (1985)의 free flow electrophoresis를 이용한 방법에서는 각각 7.2배와 13.7배로서, 본 연구에서 비교적 잘 정제된 BLM 및 BBM 막소포를 제조하였음을 알 수 있었다.

BLM에서의 PAH이동기전에는 여러가지 가설이 있으나 최근에 이르러 acid/acid exchange system인 것으로 정립되고 있으며, vesicle을 이용한 연구결과에 의하면 OH⁻, Cl⁻, sulfate 등의 무기음이온이나 oxoglutarate와 같은 유기음이온이 PAH와 상호교환되는 것으로 알려져 있다(Low 등, 1984). 본 연구에서는 예비실험을 통하여 vesicle내에 1 mM의 α -ketoglutarate를 첨가하였을 때 PAH의 uptake가 증가됨을 관찰하였으며, 초기 (60초)의 uptake치가 평형상태 (60분)의 uptake치보다 약 1.3배로 "overshoot" 현상이 관찰되었으며, 이것은 2 mM probenecid에 의하여 억제됨으로써 BLM vesicle에서의 PAH uptake가 carrier-mediated system에 의하여 이루어짐을 확인하였다.

포도당은 BBM에 존재하는 Na⁺-solute cotransport system에 의하여 세뇨강액으로부터 신세뇨관 상피세포내로 능동적으로 운반된다. 따라서 신세뇨관 상피세포내의 포도당 농도는 증가하게 되고 축진적 확산에 의하여 BLM을 통하여 혈액내로 운반됨으로써 재흡수된다 (Turner와 Moran, 1982). BBM vesicle을 이용한 연구에서 포도당 uptake은 Na⁺ 경사에 의하여 현저히 증가되며, energy를 필요로 하는 능동적 과정이라는 것과 phlorizin에 의하여 억제된다는 사실이 증명되었다 (Aronson과 Sacktor, 1975). 그리고 경시별로 포도당 uptake 측정시 rat(Kinne 등, 1975), 토끼 (Beck와 Sacktor, 1978) 및 사람 (Turner와 Silverman, 1977) 등에서 초기에 uptake가 급격히 증가하는 "overshoot" 현상이 나타났으며, phlorizin에 의하여 이런 "overshoot" 현상이 완전히 소실된다고 하였다(Turner와 Silverman, 1977). 본 연구에서는 예비실험을 통하여 vesicle buffer에서 Na⁺을 K⁺으로 대체시켰을 때, 또는 phlorizin을 incubation buffer에 첨가함에 의하여 BBM vesicle에서의 포도당 uptake이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 즉 Na⁺ 의존성 및 phlorizin 감수성 포도당 uptake을 관찰하여 전자들의 보고와 일치된 결과를 얻었다. 그리고 경시별 uptake을 실시한 결과 60초에서의 uptake가 평형상태 (60분)에서보다 약 4.1배 증가하여 Na⁺ 의존성 포도당 uptake의 전형적인 "overshoot" 현상을 나타내었다.

아미노산은 BBM에 존재하는 운반단백질에 의하여 신세뇨관 상피내로 Na⁺ 과함께 능동적으로 이동하는 것으로 알려져 있으며(Fass 등, 1977), 아미노산의 group에 따라서 각기 다른 특성의 운반체가 존재하는 것으로 알려져 있다(Silbermagl, 1985). 본 연구에서는 대조군의 BBMV에서 leucine uptake치가 60초에서 평형상태의 약 3.2배로 "overshoot" 현상을 나타냈으며, Na⁺을 K⁺으로 대체시 이런 현상이 억제되어 전자들의 보고와 일치하는 결과를 얻었다.

Uranium과 그 염들은 실험적으로 신장독성을 유발하는데 사용되는 중금속류의 물질로서 신세뇨관 세포의 괴사를 유발하며, 포도당과 PAH의 최대이동능(Tm)을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Nomiya와 Foulkes, 1968). 신피질절편을 이용한 다른 실험에서는 rat에 uranyl nitrate 투여시 NMN의 이동은 억제되었으나, PAH의 이동에는 변화가 없는 것으로 보고되어 있다 (Hirsh, 1973). 본 연구에서는 뇨당, BUN 및 혈청 creatinine의 증가, 신세뇨관의 괴사 등을 관찰하였으며, vesicle uptake 실험에서 포도당과 leucine의 uptake 억제와 PAH uptake의 증가를 나타내었다. Kacew와 Hirsh (1981)는 신피질절편을 이용한 실험에서, 중금속류인 potassium dichromate를 5 mg/kg body wt(s.c.) 투여시에는 PAH의 이동이 증가되었으나 투여량을 증가시켜 24-40 mg/kg body wt (s.c.) 투여시에는 PAH의 이동이 현저히 감소되었다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서의 uranyl acetate에 의한 BLMV에서의 PAH uptake치의 증가도 potassium dichromate에서와 유사한 독성기전에 의한 것으로 사료된다. 즉, 소량의 중금속에 의하여 PAH의 막이동이 촉진되나, 다량의 중금속 투여시에는 막자체에 병리적인 변성이 일어나서 막이동 기전이 손상되어 PAH의 이동이 감소되는 것으로 추정된다.

이상의 연구와 같이 신장독성을 평가하는데 기존의 병리조직학적 방법과 임상병리학적 방법에 renal membrane vesicle을 이용한 vesicle uptake system이 보완되면 보다 정확하고 신속하게 신장독성을 구명할 수 있을 것이며, 특히 vesicle uptake system은 BLM과 BBM을 각각 분리하여 실험함으로써 신장 독성물질의 작용부위 및 작용기전을 연구하는데 매우 유용하리라 사료된다.

결 론

Uranyl acetate를 성숙한 New Zealand White 수토끼에 투여한 후, 신장의 피질부를 절제하여 기저층

막소포 (basolateral membrane vesicle, BLMV)와 채모연소포(brush border membrane vesicle, BBMV)를 제조하였다. 제조한 소포를 이용하여 유기음이온의 일종인 *p*-aminohippurate (PAH), 아미노산의 일종인 leucine 및 포도당의 마이동을 측정하고, 이와 병행하여 뇨중에서의 신장유래 특이효소 활성도 측정, 임상화학 및 병리조직학적 검사를 수행하여 무투약 대조군에서 보인 결과와 비교함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. BLM의 표지효소인 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성도는 BLMV에서 microsomal homogenate에 비하여 12.3배의, BBMV의 표지효소인 alkaline phosphatase의 활성도는 BBMV에서 microsomal homogenate에 비하여 10.1배의 높은 활성을 나타내어 본 실험에서 제조한 vesicle system의 순수도가 높음이 증명되었다.
2. BLMV에서의 PAH uptake는 무투약대조군에 비하여 uranyl acetate에 의하여 absolute 및 probenecid-sensitive uptake가 증가되었다.
3. Uranyl acetate에 의하여, BBMV에서의 포도당 uptake는 absolute 및 phlorizin sensitive uptake가 무투약대조군에 비하여 현저히 억제되었다.
4. Uranyl acetate에 의하여, BBMV에서의 leucine uptake는 absolute 및 Na^+ -dependent uptake가 무투약대조군에 비하여 현저히 억제되었다.
5. 임상화학적 분석결과, uranyl acetate에 의하여 뇨중의 포도당의 배설량은 유의한 증가를 ($p < 0.01$) 그리고 혈청중에서는 BUN치와 creatinine치가 유의한 증가를 ($p < 0.05$) 나타내었다.
6. 병리조직학적 검사에서는 투여된 uranyl acetate에 의하여 근위곡세뇨관 상피세포의 망상공포형성, 원위곡세뇨관 상피세포의 괴사, 탈락 및 붕괴와 Henle계제의 확장 및 요원주 형성이 관찰되었다.

참 고 문 헌

- Aronson, P.S. and Sacktor, B. (1975): The Na^+ gradient-dependent transport of D-glucose in renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6032-6039.
- Beck, J.C. and Sacktor, B. (1978): The sodium electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5531-5535.
- Berner, W. and Kinne, R. (1976): Transport of p-aminohippurate by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Pflugers Arch.*, **361**, 269-277.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analt. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Ella, N., Slack, C.-C., Liang, T. and Sacktor, B. (1977): Transport of L-proline and D-glucose in luminal(brush border) and contraluminal(basal-lateral) membrane vesicles from the renal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **77**, 891-897.
- Endou, H. (1987): Use of isolated segments for the evaluation of nephrotoxicity. In: Safety Assessment of Chemicals *in vitro*. Proceedings of the 1st Korean-Japan Toxicology Symposium., 57.
- Fass, S.J., Hammerman, M.R. and Sactor, B. (1977): Transport of amino acids in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **252**, 583-590.
- Gandolfi, A.J. and Brendel, K. (1990): *In vitro* systems for nephrotoxicity studies. *Toxicol. in vitro* vol. 4. No. 4/5, 337-345.
- Goren, M.P., Wright, R.K., Horowitz, M.E. and Meyer, W.H. (1986): Enhancement of methotrexate nephrotoxicity after cisplatin therapy. *Cancer*, **58**(12), 2617-2621.
- Hirsh, G.H. (1973): Effect of chronic lead treatment on renal function. *Toxicol.*

- Appl. Pharmacol.*, **50**, 533-538.
- Holohan, P.D. and Ross, C.R. (1980): Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 1. Countertransport studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 191-197.
- Inui, K.I., Tomonobu, O., Takano, M., Kitazawa, S. and Hori, R. (1981): a simple method for the isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 150-154.
- Jorgenson, P.L. and Skou, J. (1971): Purification and characterization of (Na⁺ – K⁺)-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of (Na⁺ – K⁺)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *Biocim. Biophys. Acta.*, **233**, 366-380.
- Kacew, S. and Hirsh, G. H. (1981): Evaluation of nephrotoxicity of various compounds by means of *in vitro* techniques and comparison to *in vivo* methods. In: Toxicology of Kidney. Ed. Hook, J.B., Raven Press, N.Y., 77-98.
- Kelsen, D.P., Alcock, N. and Young, C.W. (1985): Cisplatin nephrotoxicity: Correlation with plasma platinum concentrations. *Am. J. Clin. Oncol.*, **8**(1), 77-80.
- Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M. and Sachs, G. (1975): Sugar transport by renal plasma membrane vesicles: Characterization of the systems in the brush border microvilli and basolateral plasma membranes. *J. Membr. Biol.*, **21**, 375-395.
- Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R. (1979a): Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta.*, **552**, 468-477.
- Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R. (1979b): Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 443-450.
- Low, I., Friedrich, T. and Burckhardt, G. (1984): Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, **246**, F334-F342.
- Mollitoris, B.A. and Simon, F.R. (1985): Renal cortical brush-border and basolateral membranes: Cholesterol and phospholipid composition and relative turnover. *J. Membr. Biol.*, **83**, 207-215.
- Nomiyama, K. and Foulkes, E.C. (1968): Some effects of uranyl acetate on proximal tubular function in rabbit kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**, 291-306.
- Offerman, J.J., Meijer, S., Sleijfer, D.T. and Piers, D.A. (1986): 131I-hippurate clearance in the detection of cisplatin nephrotoxicity. *Nuklearmedizin*, **25**(1), 39-40.
- Pariat, C., Courtois, P., Cambar, J., Pirious, A. and Bouquet, S. (1988): Circadian variations in the renal toxicity of gentamicin in rats. *Toxicology Letters*, **40**, 175-182.
- Ross, C.R. and Holohan, P.D. (1983): Transport of organic anions and cations in isolated renal plasma membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 65-85.
- Scalera, V., Huang, Y.K., Hildemann, B. and Murer, A. (1981): A simple isolation method for basal-lateral plasma membranes from rat kidney cortex. *Membr. Biochem.*, **4**, 49-61.

- Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, J., Haase, W. and Murer, H. (1980): A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. *Biochem. J.*, **186**, 177-181.
- Silbernagl, S. (1985): Amino acids and oligopeptides. In: The Kidney Ed. Seldin, D.W., Giebisch, G., 1677-1701, Raven Press, New York.
- Turner, R.J. and Moran, A. (1982): Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport site along the proximal tubule: Evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.*, **242**, F406-F414.
- Turner, R.J. and Silverman, M. (1977): Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidneys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2825-2829.
- Tyson, C.A., Dabbs, J.E., Cohen, P.M., Green, C. E. and Melnick, R. L. (1990): Studies of nephrotoxic agents in an improved renal proximal tubule system. *Toxiol. in vitro.* vol. 4, No. **4/5**, 403-408.
- Ulrich, K.H., Hans, R.P., Christian, J. and Sheikh, M.I. (1984): Renal transport of neutral amino acids: Tubular localization of Na⁺-dependent phenylalanin- and glucose-transport systems. *Biochem. J.*, **220**, 15-24.
- 이영재 등 (1992): 신장근위곡세뇨관 소포를 이용한 신장독성 실험모델 개발: 1. Gentamicin이 토끼 신장근위곡세뇨관 소포에서의 물질이동에 미치는 영향. 서울대수의대논문집, **17**(1), 1-13.