

## 흰쥐 신피질 세포막과 소포체막의 calcium 수송에 미치는 cadmium 및 metallothionein의 영향에 관한 연구

최임순 · 김옥용 · 박용빈

연세대학교 이과대학 생물학과

흰쥐의 신피질 세포막과 소포체막을 분리하여 카드뮴 및 Metallothionein(MT)을 투여하였을 때 세포막에 존재하는 Ca-ATPase에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 전기영동상에서 분리된 MT가 분자량 12KD 정도의 위치에 band가 나타났으며, 분리한 각 세포의 막에 카드뮴을 농도별로 처리하였을 때 고농도일수록 Ca-ATPase의 활성도가 감소하였으나, MT를 처리한 경우 신피질 세포막은 거의 대조군과 유사한 결과를 나타냈고, 소포체막에 MT를 처리한 경우는 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 카드뮴을 처리한 경우와 유사하였다. 이와같은 결과로 보아 카드뮴은 세포막의 Ca-ATPase의 활성을 저하시켜 세포내 칼슘 항상성에 영향을 미치는 MT는 Ca-ATPase의 활성을 회복시켜 카드뮴에 의한 세포독성의 방어작용에 부분적으로 작용한 것으로 생각된다.

**KEY WORDS: Ca-ATPase, Rat kidney cortex, Renal plasma membrane, Microsome, Metallothionein**

생물체에 카드뮴이 침입하면 양이나 시간 및 경로에 따라 카드뮴이 여러 생체조직에 축적되어 다양한 독성을 나타내는데(Shukla and Singhal, 1984) 만성으로 작용할 경우 신장의 기부선회소관 위축과 퇴화작용이 일어난다(Schroeder *et al.*, 1965). 카드뮴의 독성에 대한 기작은 아직도 모두 밝혀져 있지 않았으나 세포내 칼슘대사와 밀접한 관련이 있으며 서로 특이적인 상호작용도 한다고 알려져 있다(Verboost *et al.*, 1989).

정상적인 세포내 칼슘의 항상성은 세포막에 존재하는 칼슘 수송체계에 의하여 일정농도를 유지하도록 조절된다. 그러나 상해를 입은 세포에 있어서는 칼슘 유입의 증가, 세포내 칼슘격리소기관에서의 유출증가 또는 세포막을 통한 칼슘의 세포 밖으로의 유출억제등이 나타나 세포내 칼슘농도의 조절이 어렵게 되어서 결국 세포의 치사

를 일으킨다(Nicotera *et al.* 1989).

신장은 카드뮴에 만성으로 장해를 받았을 경우의 표적기관이라고 할 수 있다. 생물체에 카드뮴이 침입하면 간에서 metallothionein(MT)이라는 저분자량의 단백질이 생성되어 Cd-MT의 형태로 간으로부터 방출되고 이는 순환경로를 통하여 신장에 흡수된다(Dudley *et al.*, 1985). 신장의 사구체에서 여과될 때 Cd-MT로부터 분리된 카드뮴이온은 신장에 손상을 입힐 수 있다고 한다(Louis and Klaassen, 1988).

카드뮴은 세포막과 소포체막의 Ca-ATPase와  $\text{Ca}^{2+}$  결합 부위에 대해서  $\text{Ca}^{2+}$ 과 비슷한 친화력을 가지므로(Ghijzen *et al.*, 1982), 카드뮴이 침입하면 세포막이나 소포체막의  $\text{Ca}^{2+}$  수송이 억제되어 세포내 항상성이 깨어지게 된다(Verboost *et al.*, 1987).

본 실험에서는 간으로부터 유출된 Cd-MT와 Cd이 신피질 세포막과 소포체막에 어떠한 영향을 주며, 이는 칼슘의 이동현상과 어떠한 연관성이 있는지 알아보기 위하여 흰쥐의 신피질 세포

본 연구는 1991년도 한국학술진흥재단 연구비 지원에 의한 것임

막과 소포체막을 분리하고 Cd와 MT를 처리하였을 때 막에 존재하는 Ca-ATPase의 활성도를 측정하여 막에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

체중 180-220g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐에  $\text{CaCl}_2$ 를 피하주사하여 간을 적출한 후 Seigo 등의 방법(1981)으로 세포질의 파쇄액을 얻어 Sephadex G-75 column에 용출시키고 Cd-MT부분만을 모았으며 이 시료는 digestion을 실시하고 AAS(atomic absorption spectrophotometer)를 이용하여 카드뮴을 정량하여 Cd-MT부분임을 확인하였다. 이렇게 모은 시료를 DEAE Sephadex A-25 이온교환수지와 desalting을 통하여 냉동건조시켰다. 분리한 농축 시료를 Laemmli의 방법(1970)으로 12.5% gel에서 전기영동을 시행하여 나타난 MT band를 확인하고 잘라내어 용출시켜서 세포막과 microsome의 Ca-ATPase 활성검사에 사용하였다.

신피질 세포막의 분리에는 van Heeswijk 등의 방법(1984)을 이용하였고, microsome은  $\text{CaCl}_2$  침전법(Cinti *et al.*, 1972)을 일부 변형하여 분리하였다. 분리한 세포막과 microsome에 카드뮴을 농도별(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리한 경우와 MT를 처리한 경우 각각 Ca-ATPase의 활성을 조사하였다. 칼슘의 능동 수송에 관련된 효소로서 Rorive와 Kleinzeller의 방법(1974)을 이용하였고, Na-K ATPase의 활성은 1mM의 ouabaine으로 억제하였으며, 형성된 유리인의 양을 측정하여 효소활성도를 산출하였다(Chen *et al.*, 1966).

## 결과

세포질 분획을 Sephadex G-75 column에서

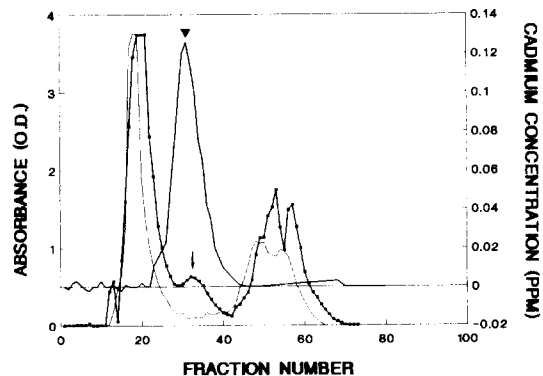
용출시킨 결과 대조군에서는 14번 분획으로부터 서서히 증가하여 고분자량의 단백질이 존재하는 20번 분획을 전후해서 peak가 나타났으며, 40번 분획에서 60번 분획 사이에 분자량이 작은 단백질 peak가 나타났다. 이에 반하여 저농도의 카드뮴을 처리한 군에서는 대조군에서 나타난 peak외에도 대조군에 존재하지 않았던 MT peak가 35번을 전후하여 나타났다(Fig. 1).

Sephadex G-75 column에서 용출된 분획별로 모은 시료의 카드뮴정량을 한 결과 MT peak와 동일한 부위에서 카드뮴 peak가 나타났으며, 카드뮴 농도는 peak부분이 0.13ppm이었다.

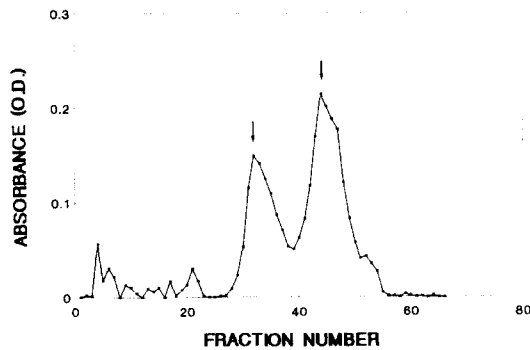
Sephadex G-75 column의 peak 부분만을 농축하여 DEAE Sephadex A-25 column에서 이온교환을 한 뒤 254nm에서 흡광도를 조사한 결과 34번을 전후하여 MT-II의 peak와, 46번을 전후하여 MT-I의 peak를 확인하였다(Fig. 2).

Sephadex G-15 column을 이용하여 용출된 각 분획을 spectrophotometer로 254nm에서 측정된 결과 15번 분획을 중심으로 salt가 제거된 MT-peak가 나타났다(Fig. 3).

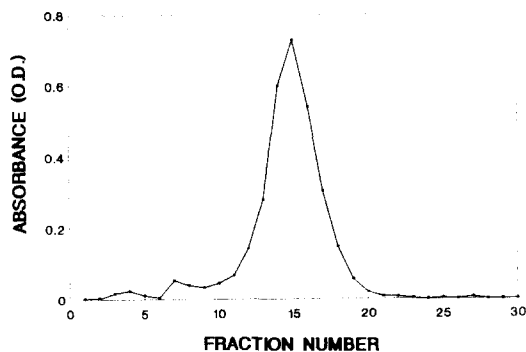
5mM Tris-HCl을 이용하여 농축된 시료의 단백질량을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조정된 후 전기영동을 실시한 결과 분자량 12KD 부근에서 MT band가 나타났으며, 대조군의 세포질 분획에 비하여



**Fig. 1.** Elution profile of the Cd-treated rat cytosol by Sephadex G-75. The indicate (↓) shows the protein peak. Cd peak by AAS is found at the same position (▼) on the X axis. —: control rat cytosol (254nm) - -: AAS - -: Cd-treated rat cytosol (254nm)



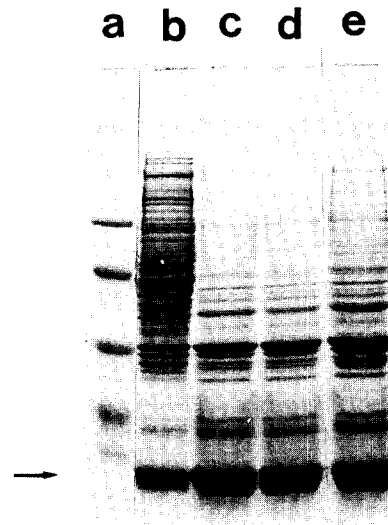
**Fig. 2.** Elution profile of the Sephadex G-75 peak fractions by DEAE Sephadex A-25. Cd-MT fractions by Sephadex G-75 were collected by linear gradient of sodium chloride (5mM-400mM). Two MT peaks (↓) are shown.



**Fig. 3.** Elution profile of the Sephadex A-25 peak fractions by Sephadex G-15. The peaks of the fraction numbers (10~20) are desalted MT proteins.

31KD 부위에 band는 양이 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

Ca-ATPase의 활성도를 측정하기 위하여 신피질 세포막에 5 µg/ml의 카드뮴을 처리한 경우 활성도가 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고 (p<0.05), 20 µg/ml과 50 µg/ml의 카드뮴을 처리한 경우 78.7%, 70.8%로 각각 유의하게 감소하였다(p<0.005)(Table 1). 그러나 Cd-MT를 처리한 경우 활성도가 97.0%로 대조군에 비슷하게 회복되었다(Table 1). 이러한 현상은 소포체막에서도 유사한 현상으로 나타나 카드뮴을 농도별로 처리한 경우 활성이 대조군에 비하



**Fig. 4.** Comparison of proteins of several samples. CBB staining after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was carried out. a: marker protein (66kd, 45kd, 31kd, 18.4kd, 14.3kd) b: liver cytosol c,d,e: purified MT-peak protein (→): MT protein band

**Table 1.** Comparisons of Ca-ATPase activities of kidney plasma membranes in the rat treated by various Cd concentrations and metallothionein

treatment	enzyme activity <sup>☆</sup>	% <sup>☆☆</sup>
control	5.769 ± 0.023	100
5 µg/ml	5.441 ± 0.016	94.3*
20 µg/ml	4.539 ± 0.034	78.7**
50 µg/ml	4.083 ± 0.051	70.8**
Cd-MT	5.596 ± 0.048	97.0***

Data are expressed as mean ± S.E. with 4 experiments. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. \*p<0.05: compared with the control group. \*\*p<0.005: compared with the control group. \*\*\*p<0.005: compared with the 20 µg/ml and 50 µg/ml Cd-treated groups ☆: µg/ mg protein /min ☆☆: percentage relative to the control group

여 유의하게 감소한 반면 MT를 처리한 경우 약간 회복되는 경향으로 나타났으며 세포막에서와 같이 회복되지는 않았다(Table 2).

**Table 2.** Comparisons of Ca-ATPase activities of microsomes of kidney cells in the rat treated by various Cd concentrations and metallothionein

treatment	enzyme activity <sup>☆</sup>	% <sup>☆☆</sup>
control	5.394 ± 0.039	100
5 µg/ml	4.686 ± 0.025	86.9*
20 µg/ml	4.286 ± 0.051	79.5**
50 µg/ml	3.902 ± 0.021	72.3**
Cd-MT	4.259 ± 0.041	79.0***

Data are expressed as mean ± S.E. with 4 experiments. Student's t-test was used for statistical analysis of the data. \*p<0.05; compared with the control group. \*\*p<0.005; compared with the control group. \*\*\*p<0.05; percentage relative to the 50 µg/ml ☆: µg/mg protein/min ☆☆: percentage relative to the control group

## 고찰

카드뮴을 투여하였을 때 흰쥐 세포막에서의 칼슘 pump의 억제로 인하여 칼슘과 연관된 많은 과정에 영향을 미친다는 사실은 이미 알려져 있다(Verboost *et al.*, 1988; Roch and Maly, 1979). 물고기의 경우 카드뮴이 침입하면 카드뮴 독성작용에 의한 저칼슘증세를 나타낸다(Giles, 1984). 또한 카드뮴을 투여하였을 때 세포의 치사현상이 일어나는 것은 칼슘이온 농도 변화보다는 카드뮴의 세포내 유입과 밀접한 관련이 있으며, 칼슘의 채널억제제가 세포막의 세포질 안쪽 부위로 결합하므로써 칼슘채널에 위치한 음이온 부위(anionic site)와는 구분되기 때문에 카드뮴의 세포내 축적을 억제한다는 보고도 있다(Lee and Tsien, 1983).

카드뮴에 의하여 세포내 MT가 합성된 후(Fig. 1) 카드뮴이 다시 침입되면 MT가 cystein을 다량 함유하고 있기 때문에 잔류 SH-에 의하여 카드뮴 유입이 억제되는 것으로 생각된다.

또한 카드뮴을 투여했을 때 세포내 칼슘의 mobilization과 Ca-ATPase의 억제현상이 일어난다(Perrino and Chou, 1986; Verboost

*et al.*, 1987; Diaz-Barriga *et al.*, 1989; Verboost *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1989). 이것은 calmodulin과의 연관성이나 Ca-ATPase의 Ca<sup>2+</sup> site와의 연관성을 생각할 수 있다. 카드뮴의 농도에 따라서 억제작용이 일어난다는 보고도 있다(Mazzei *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1985). 즉 카드뮴이 calmodulin과 결합하거나 Ca-ATPase에 직접 작용하여 phosphodiesterase의 활성을 억제한다고 하였으나(Filk *et al.*, 1985) Verboost 등(1989)에 의하면 카드뮴이 Ca-pump의 칼슘수송부위에 존재하는 -SH group에 대하여 친화력이 매우 강하기 때문에 이 부위에 작용하여 세포 밖으로의 칼슘의 유출을 방해한다고 하였다. 본 실험에서는 분리한 MT를 *in vitro*상태에서 처리하고 Cd-MT 또는 EDTA를 처리한 후의 두 가지에서 모두 Ca-ATPase의 활성이 거의 흡사하게 회복되는 것으로 보아 MT는 Cd와 결합하여 Cd독성에 대한 방어작용을 나타내는 것으로 보인다. 그러나 *in vivo*상태에서 Cd-MT를 줄 경우는 사구체에서 여과될 때에 압력에 의한 Cd 이온의 분리로 오히려 신장에 독성을 미치게 되며 간조직보다 신장에서의 MT합성능력이 적기 때문에 만성적으로 축적되는 카드뮴에 대하여 심한 손상을 입게된다고 한다(Louis and Klaassen 1988).

저농도의 카드뮴이 Ca-ATPase를 활성화시키기도 하고 점진적으로 억제작용을 나타내기도 하지만 고농도의 카드뮴 처리시에는 단지 억제작용만을 나타낸다고 하였다(Verboost *et al.*, 1989). 본 실험에서도 신피질 세포막에 카드뮴을 여러가지 농도로 전처리하여 Ca-ATPase의 활성을 조사한 결과 모든 처리군에서 농도에 의존하여 억제되는 현상을 나타내었다(Table. 1). 이러한 차이는 본 실험에 사용한 카드뮴의 농도가 앞에서 사용한 농도에 비하여 다소 높은 농도이므로 막의 Ca-ATPase를 억제시키는 결과만을 나타낸 것으로 생각된다.

소포체는 미토콘드리아와 함께 세포내 칼슘 농도를 조절하는 매우 중요한 장소로서 세포내 변화는 ATP가 고갈된 상태이거나 세포막의 기능

에 이상이 생겼을 때 미토콘드리아나 소포체에 손상을 줌으로써 세포쪽으로 칼슘을 방출하는 것으로 보인다. 정상세포에서의 미토콘드리아는, 칼슘을 저장하고 있는 세포내 칼슘농도를 조절하는데 세포들의 경우 대부분 미토콘드리아로부터의 칼슘 방출량은 적은 양이므로 칼슘농도가 증가되면 막의 Ca-ATPase를 통하여 일시적으로 저장하게 된다. 그러나 카드뮴에 노출되면 본 실험결과에서 처럼 활성이 억제되어(Table 2) 내부로의 칼슘저장이 어려워지게 되며 이 결과 세포내 칼슘농도의 균형은 잃게되고 세포에 2차적인 영향을 줌으로써 세포의 치사와 상관이 있을 것으로 보인다. 즉 세포내 칼슘 농도의 변화는 세포의 기능, 대사, 성장 및 분화과정등과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다(Fleckenstein *et al.*, 1983).

이상으로 카드뮴은 간조직에서처럼 단순히 카드뮴의 농도에 따른 독성만 나타나는 것이 아니므로 Cd-MT에 의한 영향과 흡수에 대하여 좀 더 깊은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

Chen, P.S., Y. Toribara and H. Waner, 1966. Microdetermination of phosphorous. *Anal.Chem.* **28**: 1756-1758.

Cinti D.L., P. Moldeus and J.B. Schen, 1972. Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Ca<sup>2+</sup>-sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **21**: 3249-3256.

Diaz-Barriga, F., L. Carrizales, L. Yanez, J.M., Hernandez, M.C.D. Robles, E. Palmer and J.L. Saborio, 1989. Interaction of cadmium with actin microfilaments. *In vitro.* **3**: 277-284.

Dudley, R.E.L.M. Gammal., and C.D. Klaassen, 1985. Cadmium induced hepatic renal injury in chronically exposed rats: Likely role of cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **77**: 414-426.

Flik, G., S.E. Bonga and J.C. Fenwick, 1985. Active Ca transport in plasmamembranes of branchial epithelium of the north American eel. *Anguilla rostraat Lesueur. Biol. Cell.* **55**: 265-272.

Fleckenstein, A., M. Frey and G. Fleckenstein, 1983. Mechanisms of Hepatocyte Injury and Death (D.

Keppler, H. Popper, L. Bianchi and W. Reutter, eds) 321-335.

Ghijsen, W.E., J.M.M.D. Jong de C.H. O.S., 1982. ATP-dependent calcium transport and its correlationwith Ca-ATPase activity in basolateral plasma membranesof rat duodenum. *Biochem. Biophys. Act.* **689**: 327-336.

Giles, M.A., 1984. Electrolyte and water balance in plasma and urine of rainbow trout during chronic exposure to cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **41**: 1678-1685.

Laemmlli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lee, K.S. and R.W. Tsien, 1983. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltazen and nitrendipine in single dailysed heart cells *Nature* **302**: 700-704.

Louis, E.S., and C.D. Klaassen, 1988. Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**: 95-102.

Mazzei, G.J., P.R. Girard and J.F. Kuo, 1984. Environment pollutant Cd biphasically and differentially regulates myosin light chain kinase and phospholipid/Ca-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **173**: 124-128.

Nicotera, P., D.J. McConkey D.P. Jones, G. Bellomo and S. Orrenius, 1989. ATP stimulates Calcium uptake and increases the free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 453-457.

Perrino, B.A. and I.N. Chou, 1986. Role of calmodulin in cadmium induced microtubule disassembly. *Cell Biol. Intl. Rep.* **10**: 565-573.

Roch, M., E.J. Maly, 1979. Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortalityin rainbow trout (*Salmogairdneri*) and the influence of temperature of toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**: 1297-1303.

Rorive, G. and A. Kleinzeller, 1974. Methods in Enzymology. Vol. 32, ed. S. Fleischer and L. Packer. Academic press. New York. P. 303-306.

Schroeder, H.A., J.J. Balassa and W.H. Vinton, 1965. Chromium, cadmium, and lead in rats. Effects on life span, tumors, and tissue levels. *J. Nutr.*, **86**: 51-66.

Seigo O., C. Gilda P. Richard and P.C. Huang, 1981. Cadmium-induced accumulation of metallothionein messenger RNA in rat liver. *J. Biol. Chem.* **256(5)**: 2180-2184.

Shukla. G.S. and R.L. Singhal, 1984. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62**: 1015-1031.

Smith, J.B., S.D. Dwyer and L. Smith, 1989. Cadmium

- evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J. Biol. Chem.* **264**: 7115-7118.
- Suzuki, Y., S.H. Chao, J.R. Zysk and W.Y. Cheung, 1985. Stimulation of calmodulin by cadmium ion. *Arch. Toxicol.* **57**: 205-211.
- van Heeswijk M.P.E.J.A.M. Geertsen and C.H. van Os, 1984. Kinetic properties of the ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> pump and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange system in basolateral membranes from rat kidney cortex *J. Membrane Biol.* **79**: 19-13.
- Verbost, P.M., G. Flik, P.K.T. Pang, R.A.C. Lock and S. E.W. Bonga, 1989. Cd inhibition of the erythrocyte Ca pump: A molecular interpretation. *J. Biol. Chem.* **264**: 5613-5615.
- Verbost, P.M., M.H.M.N. Senden and van C.H. Os., 1987 *Biochem. Biophys. Acta.* **902**: 247-252.

(Accepted September 2, 1993)

---

**Effect of Cadmium and Metallothionein on the Calcium Transport of Renal  
Plasmamembranes and Endoplasmic Reticulum Membrane of Rats**

Rhim-Soon Choe, Ok-Yong Kim and Yong-bin Park (Department of Biology, College of Science,  
Yonsei University)

The cells and microsomes isolated from the kidney cortex of the rat were treated by Cd and Metallothionein. Their influence on the Ca-ATPase on the kidney cortex was measured by the enzyme activities, yielding the following results. MT appeared in the position around 12KD of molecular weight by electrophoresis. When each membrane underwent Cd treatment, the activities of Ca-ATPase decreased along with the rise of the Cd-level. But when treated by MT, the cell membranes recovered to the level similar to the control group. Microsomes were also similar to a level comparable to the group treated with 20 µg/ml Cd. These results suggest that Cd affect the homeostasis of Ca by pulling down the activities of Ca-ATPase in rat kidney cortex cells while MT has at least partial effect on the cell's defense against Cd toxicity by recovery of Ca-ATPase activity.