

## 호르몬 한정부지를 이용한 세포 초대배양계의 확립

한호재 · 강주원 · 박권무 · 이장현\* · 양일석\*

전남대학교 수의과대학, 호르몬연구센터  
서울대학교 수의과대학\*  
(1996년 2월 9일 접수)

### Functional characterization of primary culture cells grown in hormonally defined, serum-free medium and serum-supplemented medium

Ho-jae Han, Ju-won Kang, Kwon-moo Park, Jang-herm Lee\*, Il-suk Yang\*

*College of Veterinary Medicine, Hormone Research Center, Chonnam National University*  
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University\**

(Received Feb 9, 1996)

**Abstract** : This study investigated the properties of primary cultured proximal tubule cells in hormonally defined(insulin, transferrin, and hydrocortisone), serum-free medium or 10% serum-supplemented medium.

The growth rate of the primary cultured proximal tubule cells was lower in the hormonally defined, serum-free medium than in the 10% serum-supplemented medium( $p < 0.05$ ), while the activities of brush border marker enzymes, alkaline phosphatase(AP), leucine aminopeptidase(LAP), and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP) were increased( $p < 0.05$ ). The activities of these enzymes, however, decreased with the lapse of incubation time to 50-70% after 6 days culture compared to those of the freshly-prepared proximal tubules. The enzymatic activities of the primary cultured proximal tubule cells on 6, 9, 12, and 15 days of culture were significantly increased in the hormonally defined, serum-free medium compared to the 10% serum-supplemented medium( $p < 0.05$ ). The functional differentiation of the primary culture was examined by observing multicellular domes of the confluent monolayer, which is indicative of transepithelial solute transport. The dome formation by the proximal tubule cultures occurred at a higher frequency in the hormonally defined, serum-free medium than in the 10% serum-supplemented medium( $p < 0.05$ ). Upon electron microscopic examination, an increased density of the brush border was observed in the hormonally defined, serum-free medium compared to the cells grown in 10% serum-supplemented medium.

---

본 연구는 한국과학재단의 호르몬연구센터(HRC-95-0404)와 '95 핵심전문연구비(951-0612-024-1)의 지원을 받아 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Ho-jae Han, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwang-ju 500-757, Republic of Korea.

The activities of  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter( $^{14}\text{C}$ -a-MG uptake),  $\text{Na}^+$ /phosphate cotransporter( $^{32}\text{P}$  uptake) and  $\text{Na}^+$  transporter( $^{22}\text{Na}^+$  uptake) in the brush border membrane, and of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase( $^{86}\text{Rb}$  uptake) in the basolateral membrane were significantly stimulated in the hormonally defined, serum-free medium than in 10% serum-supplemented medium( $p < 0.05$ ).

In conclusion, the primary cultured proximal tubule cells grown in the hormonally defined, serum-free medium demonstrated a slower growth rate, but the functions of cell were enhanced.

**Key words** : kidney, cell culture, serum, transporter.

## 서 론

신장 근위세뇨관은 사구체 모세혈관으로부터 여과된 물질을 재흡수 또는 배설함으로써 체내의 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 한다. 이러한 신장의 기능에 관한 실험들은 생체내에서 직접 실시되거나 세뇨관을 적출해서 혹은 소포를 만들어서 수행되어져 왔다<sup>1,2</sup>. 그러나 이 방법들은 실험이 번거로울 뿐만 아니라 결과의 재현성이 떨어지는 등 여러가지 문제점들을 갖고 있다. 따라서 신장의 기능을 연구하는데 있어서 정확하고 재현성이 있는 결과를 얻을 수 있는 세포배양 방법이 개발되어 이용되고 있다<sup>3</sup>.

신장의 기능을 연구하기 위해 사용되는 cell line은 MDCK (개), LLC-PK<sub>1</sub>(돼지), A6(개구리), OK(주머니 쥐) 및 JTC-12-P<sub>3</sub>(원숭이) 등이 있다<sup>4-8</sup>. 이들 cell line 세포들은 제각기 고유한 특성들을 유지하고 있는데 예를 들면 MDCK 세포는 원위세뇨관이나 집합관의 특성만을<sup>9</sup> 그리고 LLC-PK<sub>1</sub> 세포는  $\text{Na}^+$ /glucose 공동운반체를 가지고 있어서 근위세뇨관 세포의 모델로 사용되고 있으나<sup>10</sup>, 이 세포의 전해질 수송은 salmon calcitonin이나 ADH에 의해서 조절되어지는 등 원위세뇨관의 특성을 보여주고 있다. 이와같이 확립된 cell line 세포는 신장의 특정부위의 특성을 주로 보유하고 있다는 장점은 있지만, 생체내의 세포에 비해 기능이 저하 또는 소실되기 때문에 정상적인 생리적 기능변화의 연구에 이용하는 데는 많은 문제점이 있다<sup>11</sup>. 따라서 직접적인 생체실험이나 cell line을 이용한 실험의 단점을 보완하기 위해서 혈청을 이용한 초대배양 방법이 고안되었다.

초대배양 방법으로 배양된 세포는 동물로부터 직접 조직을 적출하여 사용하기 때문에 생체내에 존재하는 수송체와 호르몬에 대한 반응을 유지하는 장점이 있다<sup>12</sup>. 그러

나 세포의 기능이 약화되거나 상실되며, 서로 다른 세포들이 혼재되어 유전적으로 표현형이 불안정하다는 단점을 가지고 있다<sup>13,14</sup>. 또한 혈청을 첨가하여 세포를 배양하면 섬유아세포가 과도증식되거나 세포의 고유한 기능이 변화하는 등의 단점을 가지고 있다. 따라서 초대배양시 혈청을 첨가하여 발생하는 여러가지 문제점들을 보완하는 호르몬 한정 무혈청 배지를 사용하는 방법이 고안되었다. 대부분의 동물 세포들은 적당한 호르몬, 성장인자 및 laminin이나 collagen과 같은 세포 부착인자들을 첨가하면 무혈청 배지에서도 배양될 수 있다<sup>15,16</sup>. 호르몬 한정 무혈청 배지에서 초대배양된 근위세뇨관 세포는  $\text{Na}^+$ /glucose 공동운반체<sup>17,18</sup>,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  상호운반체<sup>19</sup> 및  $\text{Na}^+$ /phosphate 공동운반체<sup>20</sup>를 비롯한 근위세뇨관의 특성을 유지하고 있어서 cell line 세포에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 혈청배지와 호르몬 한정 무혈청 배지에서 초대배양된 근위세뇨관 세포의 기능적 특성을 비교분석함으로써 세포를 이용한 연구의 체외 실험모델의 확립은 물론 세포 수준의 기초연구 기반을 마련하는데 있다.

## 재료 및 방법

**실험재료** : 체외실험동물사육소(경기도 용인)에서 분양 받은 New zealand white 수컷 토끼(1.3~1.8kg)를 사용하였다. 기본배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 Nutrient Mixture F-12(Ham)(Gibco BRL)의 1:1 혼합체(glucose 3,151mg/1,000ml 포함)를 사용하였다. 모든 실험에 사용한 배지는 항생제를 첨가하지 않았지만 근위세뇨관 분리과정에서 사용한 배지에는 penicillin G 192IU/ml와 streptomycin 200 $\mu\text{g}$ /ml를 첨가하였다. 배지는 증류수(중외제약)에 녹여 pH를 7.3으로 적정한 후 0.22 $\mu\text{m}$  Millipack filter(Millipore)로 여과시켜 사용하였다.

Collagenase, Soybean trypsin inhibitor, Trypsin 2.5% 및 Fetal Bovine Serum 등은 Gibco BRL에서 구입하였다. Insulin, Hydrocortisone, Apo-transferrin, L-leucine-p-nitroanilide,  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide 및 HEPES(N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside 및  $^{86}\text{Rb}$  등은 Dupont/NEN에서 각각 구입하였다. Acrylamide/Bis, TEMED 그리고 단백질 분석 염색시약은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다. 그 이외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

성장인자로 사용한 insulin은 0.01N HCl, transferrin과 hydrocortisone은 증류수에 각각 녹여서 Nalgene filter apparatus(0.22 $\mu\text{m}$ )에 여과시킨 후 분주하여 냉장 및 냉동보관하면서 사용하였다.

사구체를 제거하기 위해 관류과정에서 사용된 0.5% 산화철 용액[iron oxide solution(wt/vol)]은 Cook와 Pickering<sup>21</sup>이 기술한 방법대로 sodium hydroxide(1.3g)와 potassium nitrate(10g)는 산소가 포화된 증류수 50ml에, ferrous sulfate(4.5g)는 증류수 50ml에 각각 용해시킨 후 혼합하여 암록색이 될 때까지 가열하였다. 이렇게 준비된 iron oxide는 증류수로 3회 세척한 후 0.9% NaCl로 부유시켜 멸균하였다. 관류과정에서 이용한 iron oxide용액은 PBS(phosphate buffered saline: NaCl 140mM, KCl 2.7mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1mM, pH 7.4)로 5배 희석하여 사용하였다.

#### 실험방법;

토끼 신장 근위세뇨관 세포의 초대배양 : 토끼 신장 근위세뇨관 세포의 초대배양은 Chung 등<sup>15</sup>의 방법을 변형한 것으로 수컷 토끼(1.3~1.8kg)를 경추 타격으로 안락사시킨 후 신동맥과 정맥을 그대로 유지한채 즉시 신장을 적출해 지방과 주위조직을 제거한 다음 기본배지에 penicillin G 192IU/ml와 streptomycin 200 $\mu\text{g}$ /ml을 첨가하여 얼음으로 차게한 배지에 보관하였다. 적출된 신장은 신동맥에 끝이 무딘 19호 주사바늘을 삽입하여 외과용 실로 고정한 후 혈액이 완전히 제거될 때까지 멸균된 PBS로 관류시킨다. 이어서 0.5% iron oxide 용액으로 피질이 암회색으로 될 때까지 관류시킨 후 항생제가 첨가된 기본배지로 관류시켰다. 피막을 박리시킨 후 외과용 가위를 사용하여 피질부분을 약 0.5cm 정도의 조각으로 잘라내어, 멸균된 조직 균질기로 3~4회 갈아 두 층(254 $\mu\text{m}$ 와 85 $\mu\text{m}$ )의 나일론망을 통과시킨 후 85 $\mu\text{m}$  나일론망에 걸린 세포만을

수집하여 DME/F-12 배지가 채워진 시험관으로 옮긴다. 이들중 산화철을 포함하고 있는 사구체 세포는 멸균된 막대자석을 이용하여 제거하고, 근위세뇨관은 60 $\mu\text{g}$ /ml collagenase class IV와 60 $\mu\text{g}$ /ml soybean trypsin inhibitor로 상온에서 각각 3분씩 처리한 후 원심분리하여 3회(1,000 rpm, 5분) 세척하였다. 이렇게 준비된 근위세뇨관을 3가지 성장인자(insulin 5 $\mu\text{g}$ /ml, transferrin 5 $\mu\text{g}$ /ml, hydrocortisone  $5 \times 10^{-8}\text{M}$ )가 첨가된 기본배지에 희석하여 35mm 플라스틱 배양접시에 접종하였다. 배양은 95% air와 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유한 배양기에서 37 $^\circ\text{C}$ 를 유지하며 실시하였고 배지는 접종후 첫날 갈아주고 그 이후는 3~4일 마다 교환하였다. 단, 세포의 활성 및 생화학적 측정을 위해서는 매 실험 24시간 전에 배지를 교환하였다.

세포성장 연구 : 세포의 성장은 근위세뇨관 접종후 3, 6, 9, 12, 15일에 관찰하였다. 세포는 DME/F-12배지(pH 7.4)에 insulin 5 $\mu\text{g}$ /ml, transferrin 5 $\mu\text{g}$ /ml, hydrocortisone  $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 만을 첨가한 군과 10% 혈청을 첨가한 군으로 나누어 95% air와 5%  $\text{CO}_2$ 를 함유한 배양기에서 37 $^\circ\text{C}$ 를 유지하며 배양하였다. 각 군에서 세포수를 측정하기 전에 배양세포를 0.25% trypsin-0.1% EDTA 용액으로 10분간 처리하여 세포를 분리시킨 후 0.1% soybean trypsin inhibitor를 첨가하고 PBS로 희석하여 Coulter counter(Model ZF)로 측정하였다. 매번 세포수 측정시 3개의 배양접시를 이용하였다. 세포가 confluent하게 단층을 이룬후 dome의 관찰은 위상차 도립현미경(Olympus Co.)으로 배양접시당 20시야를 관찰하였다(시야:21.5mm  $\times$  32.5mm). 30개 이상의 배양접시를 관찰한 결과를 배양접시당 평균  $\pm$  표준오차로 나타냈다.

전자현미경 관찰 : Confluent하게 배양된 근위세뇨관 세포를 수집한 후 20분간 원심분리하여 pellet으로 만들었다. Pellet은 2.5% glutaraldehyde용액(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)에서 약 2시간동안 전고정하고 동일 완충액으로 15분씩 3회 세척하였다. 그리고 1% osmium tetroxide ( $\text{O}_8\text{O}_4$ ) 용액(0.1M cacodylate buffer, pH 7.4)에서 2시간동안 후고정한 후 동일 완충액으로 15분씩 3회 세척하였다. 세뇨관 세포는 저농도의 ethanol(50%)로부터 100% ethanol까지 탈수시키고 propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. Epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, Epon mixture 원액에서 24시간동안 포매한 후 35 $^\circ\text{C}$ 에서 12시간, 45 $^\circ\text{C}$ 에서 12시간, 60 $^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 열중합을 하였다. Epon block은 1 $\mu\text{m}$ 로 박절

하고 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여, 특정부위를 정하고 diatome을 부착시킨 ultramicrotome (LKB-V형)으로 60nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투사 전자현미경(100 C×II형, TEM)으로 80kv 가속 전압에서 관찰하였다. 주사 전자현미경 관찰에서 confluent하게 배양된 근위세뇨관 세포는 투사 전자현미경의 방법과 같이 고정하고 탈수시킨 후 ion coater를 이용하여 gold coating한 다음 주사 전자현미경으로 25kv 가속전압에서 관찰하였다.

**효소 및 단백질 분석** : 슬변연의 표지효소인 alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase 그리고  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase의 활성도를 경시별로 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성도는 Bessey 등<sup>22</sup>의 방법을 변형하여 *p*-nitrophenyl phosphate를 기질로 사용해서 시료가 가수분해되는 것을 분광광도계로 측정하였다. 먼저 배양배지를 제거하고 얼음으로 차게한 PBS(pH 8.0)로 3회 세척한 다음 세포는 상온에서 2mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate를 함유한 PBS(pH 8.5) 1ml로 15분간 배양시킨 후 상층액을 회수하여 420nm(E420 for *p*-nitrophenol=18,300)에서 흡광도를 측정하였다.

Leucine aminopeptidase 활성도는 Green 등<sup>23</sup>의 방법을 변형하여 L-leucine-*p*-nitroanilide를 기질로 사용해서 분석하였다. 활성도의 측정은 상온에서 측정용 시약(10mg L-leucine-*p*-nitroanilide/40ml PBS) 2ml과 15분간 반응시킨 후 405nm(E405 for *p*-nitroanilide=9,600)에서 흡광도를 측정하였다.

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase 활성도는 Tate와 Meister<sup>24</sup>의 방법을 이용하였으며  $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide를 기질로, glycylglycine을 아미노산 수용체로 사용하였다. 배양된 세포는 얼음으로 차게한 PBS(pH 7.3)로 3회 세척한 다음 1%(v/v) Triton x-100이 함유된 50mM imidazole buffer(pH 7.3, 23°C)로 10분간 용해시키고 용해된 실험재료는 rubber policeman으로 수집하였다. 활성도는 측정시약 920 $\mu$ l(1mM  $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide 0.2ml, 20mM glycylglycine 0.2ml, 0.1mM Tris-HCl 완충액 0.6ml, pH 8.0을 1:1:3의 비율로 혼합)를 Eppendorf tube에 넣고 항온수조(37°C)에서 10분간 배양시킨 후 준비한 80 $\mu$ l 시료를 첨가하고 10분간 반응시켜 410nm (E410 for *p*-nitroanilide=9,600)에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 단백질량은 Bradford 방법<sup>25</sup>으로 정량하여 효소의 활성도를 단백질량으로 표준화시켜 nmoles/min/mg protein으로 표시하였다.

혈청배지와 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양한 세포의 단백질 분석은 SDS-PAGE 방법으로 실시하였다. 분석에 사용할 세포는 confluent하게 배양하여 PBS(pH 7.4)로 세척한 후 0.1% SDS로 용해시켜 단백질을 정량한 후 냉동보관하였다. 전기영동후 젤은 Coomassie blue로 염색하고 탈색시켜 셀로판을 이용하여 건조보관시켰다. 단백질 지표로는 Sigma marker (M.W. 6,500~205,000, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다.

**Uptake 실험** : 호르몬 한정 무혈청 배지와 혈청배지를 사용하여 초대배양된 근위세뇨관 세포의 기능을 관찰하기 위하여 슬변연의 Na<sup>+</sup>/glucose 공동운반체(<sup>14</sup>C- $\alpha$ -MG)와 Na<sup>+</sup>/phosphate 공동운반체(<sup>32</sup>P) 그리고 Na<sup>+</sup> 운반체(<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>)와 기저막의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase(<sup>86</sup>Rb)의 활성도를 측정하였다.

<sup>14</sup>C- $\alpha$ -MG uptake 실험은 비대사성 당인  $\alpha$ -methyl-D-glucoside( $\alpha$ -MG)를 이용하여 Sakhrani 등<sup>26</sup>의 방법을 변형하여 세포가 완전하게 단층을 형성하였을 때 uptake buffer [NaCl 136mM, KCl 5.4mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.44mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44mM, HEPES 5mM, Glutamine 2mM,  $\alpha$ -MG(0.5mg/ml), Bovine serum albumin(0.5mg/ml)]로 배양세포를 3회 세척한 후에, uptake buffer에 <sup>14</sup>C- $\alpha$ -MG(0.5 $\mu$ ci/ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포는 얼음으로 차게한 washing buffer(mannitol 300 mOsm, pH 7.4)로 신속하게 3회 세척하였다. 이후 세포를 0.1% SDS 1 ml로 용해시킨 후 수집하여  $\beta$ -counter로 방사선량을 측정하였다.

<sup>32</sup>Phosphate uptake는 Rabito<sup>27</sup>의 방법으로 측정하였다. 세포단층을 uptake buffer [(NaCl 150mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, Tris-HCl 10mM, BSA(0.5mg/ml), pH 6.5)]로 3회 세척한 후, uptake buffer에 <sup>32</sup>Phosphate(0.5 $\mu$ ci/ml)와 phosphate 1mM을 첨가시켜 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 얼음으로 차게한 uptake buffer로 3회 세척하고 그 다음 단계는 <sup>14</sup>C- $\alpha$ -MG uptake와 같이 실시하였다.

<sup>22</sup>Na<sup>+</sup> uptake는 Rindler 등<sup>28</sup>의 방법으로 측정하였다. 기저막쪽에서 Na<sup>+</sup>의 이동을 억제하기 위해 DME/F-12 배지에 10<sup>-5</sup>M의 ouabain만을 첨가하여 2시간동안 전배양시키고, uptake buffer (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.4)로 3회 세척한 후 uptake buffer에 <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>(0.25 $\mu$ ci/ml)를 첨가하여 30분간 배양하였다. 배양이 끝나면 얼음으로 차게한 uptake buffer로 3회 세척하고

그 다음 단계는  $^{14}\text{C}$ -a-MG uptake와 같이 실시하였다.

$^{86}\text{Rb}$  uptake 실험은 Devis 등<sup>29</sup>이 사용한 방법으로 실시하였다. 35mm 배양접시에서 confluent하게 단층을 형성한 세포를 상온에서 uptake buffer (10mM Tris-HCl, NaCl 140mM, pH 7.4)로 3회 세척한다. 세포는 uptake buffer에 RbCl 1mM,  $^{86}\text{Rb}$ (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), BSA(0.5mg/ml)를 포함한  $^{86}\text{Rb}$  uptake buffer를 각 배양접시에 1ml씩을 분주하고, 30분동안 배양한 후에 세포단층은 얼음으로 차게한 washing buffer (Tris-HCl 10mM,  $\text{MgCl}_2$  140mM, pH 7.4)로

3회 세척하고 그 다음 단계는  $^{14}\text{C}$ -a-MG uptake와 같이 실시하였다.

모든 실험결과는 zero time uptake로 각각 교정한 후 Bradford<sup>25</sup> 방법으로 측정된 단백질 양으로 표준화시켰다. 또한 모든 실험에서 매 실험당 3개 이상의 배양접시를 사용하였다.

통계처리 : 실험성적의 통계처리는 Student's *t*-test에 의하여 유의성 검정을 실시하여 P value가 0.05이하일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

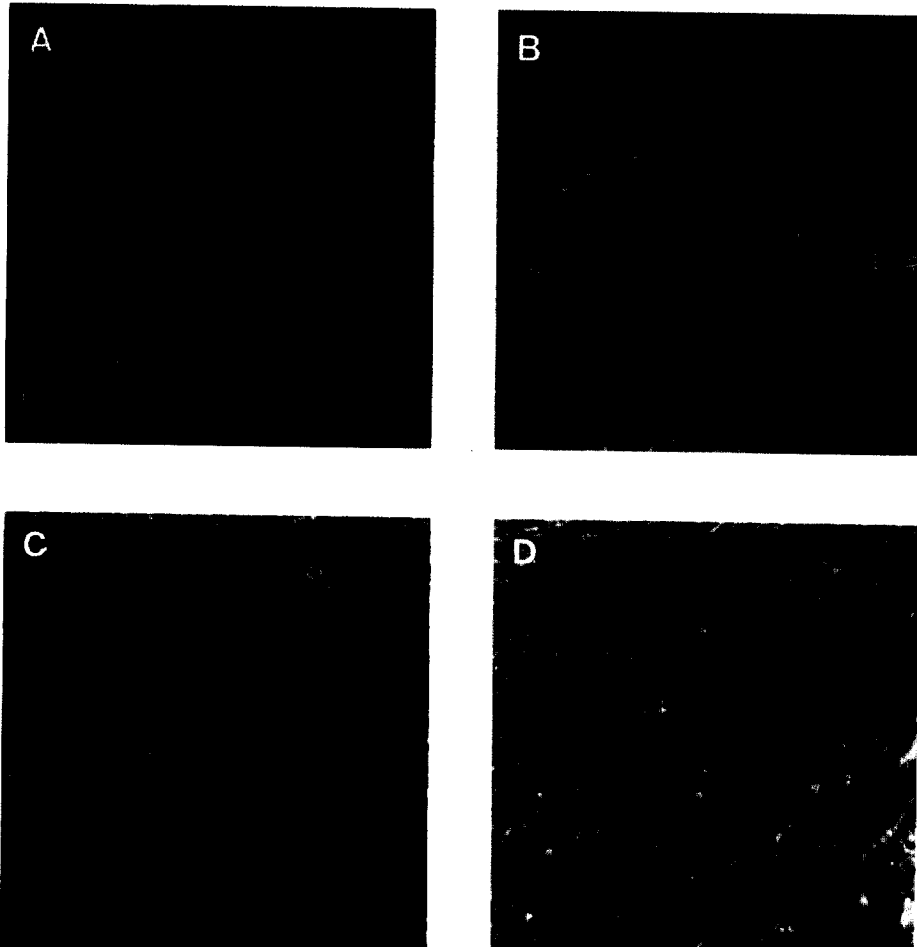


Fig 1. Phase contrast micrographs of primary rabbit proximal tubule cell cultures. Primary rabbit proximal tubule cells were grown in hormonally defined, serum-free or 10% serum-supplemented medium. Panel A: freshly isolated tubules after 1 hour of culture. Note the distinction of proximal tubular lumen. Panel B: after 3 days, epithelial cells had fully migrated from the remnant tubules. Only a small portion of the remnant tubule was still visible. Panel C: after 15 days, confluent monolayer was formed. Panel D: after 15 days, primary cultures were overgrown with fibroblast in the serum-supplemented medium( $\times 100$ ).

## 결 과

**혈청배지와 무혈청배지에서 초대배양된 근위세뇨관 세포의 성장 비교** : 광학현미경 관찰에서는 세뇨관을 접종한 후 약 1시간이 경과하면 배양접시에 근위세뇨관이 부착되었다(Fig 1A). 배양후 3~4일 부터는 상피세포들이 세뇨관으로부터 분화되어 주변에 colony가 형성되기 시작하고(Fig 1B), 이 세포의 colony들은 서로 연결되어 증식하였

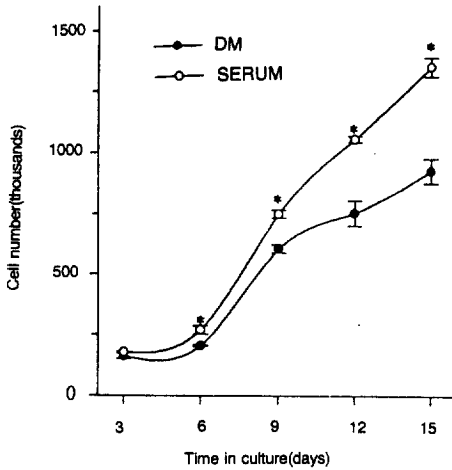


Fig 2. Time course for the growth of renal proximal tubule cells in hormonally defined, serum-free or 10% serum-supplemented medium. Values were the average  $\pm$  SE. of nine culture plates from three independent experiments(n=9).

\*  $p < 0.05$  hormonally defined vs. serum.

다. 약 15일이 경과하면 confluent하게 세포 단층을 형성하였다(Fig 1C). 한편 혈청을 첨가한 배지에서 배양한 세포에서는 섬유아세포의 과도증식이 관찰되었다(Fig 1D). 세포의 성장은 호르몬 한정 무혈청 배지와 혈청을 첨가한 배지에서 각각 배양하면서 비교하였다. 세포의 성장은 배양 6일째 부터는 거의 대수적으로 증가하였다. 세포배양 후 6, 9, 12, 15일에는 호르몬 한정 무혈청 배지에 비해 혈청을 첨가하여 배양한 세포의 숫자가 유의성 있게 증가하였다. 그리고 이 두 조건에서 배양된 세포는 배양후 15일이 경과하면 성장이 급격히 둔화되었다(Fig 2).

세포들은 완전하게 단층을 형성한 후에 분리된 세포 colony에서는 관찰할 수 없는 dome을 형성하였다(Fig 3). 35mm 배양접시를 도립현미경하에서 20시야로 나누어 관찰한 결과 호르몬 한정 무혈청 배지와 혈청을 첨가한 배지에서 dome의 수는 배양접시당 각각  $13.87 \pm 0.45$ 개,  $11.31 \pm 0.43$ 개로 호르몬 한정 무혈청 배지에서 dome의 수가  $22.63 \pm 0.05\%$  증가하였다(Table 1,  $p < 0.05$ ).

Table 1. Effect of serum on dome formation

	Hormonally defined medium	serum medium
Number	$13.87 \pm 0.45^*(39)$	$11.31 \pm 0.43(30)$

Primary rabbit proximal tubule cells were grown to confluency in hormonally defined, serum-free or 10% serum-supplemented medium. The average number domes per dish were estimated by counting 20 microscope fields at  $\times 100$  using Olympus microscope. Values were the average  $\pm$  SE. The number of experiments was given in parenthesis. \*  $p < 0.05$  hormonally defined vs. serum.

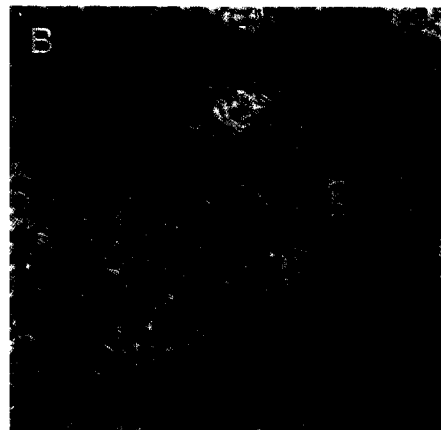
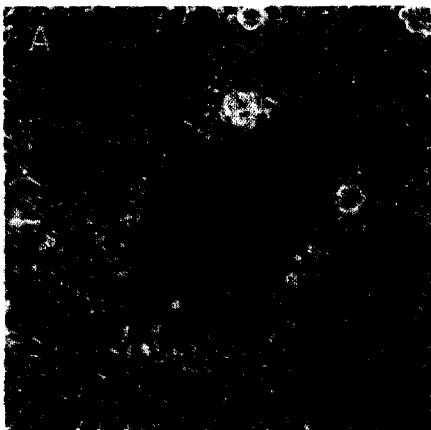


Fig 3. Dome formation in confluent cultures of proximal tubule cells. Dome was the group of cells that were slightly out of focus under microscope when focusing on the monolayer(A). The cells in the monolayer were out of focus on the cells in the dome (B) ( $\times 100$ ).

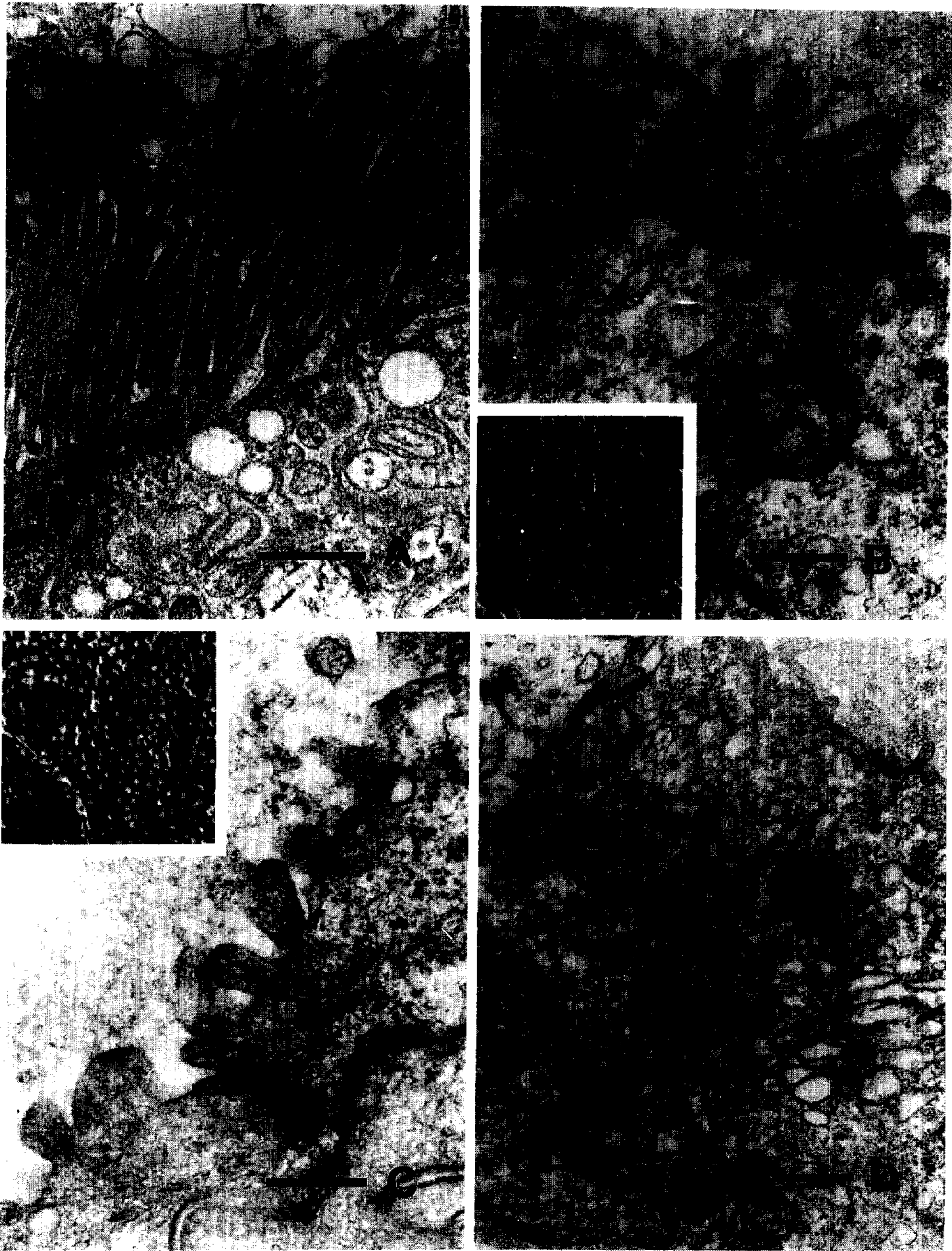


Fig 4. Transmission of electron micrographs(A, B, C & D) and scanning electron micrographs(B & C insert) of cultured rabbit kidney proximal tubule cells. Electron micrograph showing the group of proximal tubular epithelial cells with scattered microvilli on the free surface. Tight junctions were visible in this photograph. Panel A: purified proximal tubule cells. Panel B: cells grown in hormonally defined serum-free medium. Compared to the cells grown in serum, the brush border was denser but microvilli were shorter in length. Panel C: cells grown in 10% serum supplement medium. Panel D: cell organelles grown in hormonally defined serum-free medium. Bars A: 1 $\mu$ m, B-D: 0.25 $\mu$ m

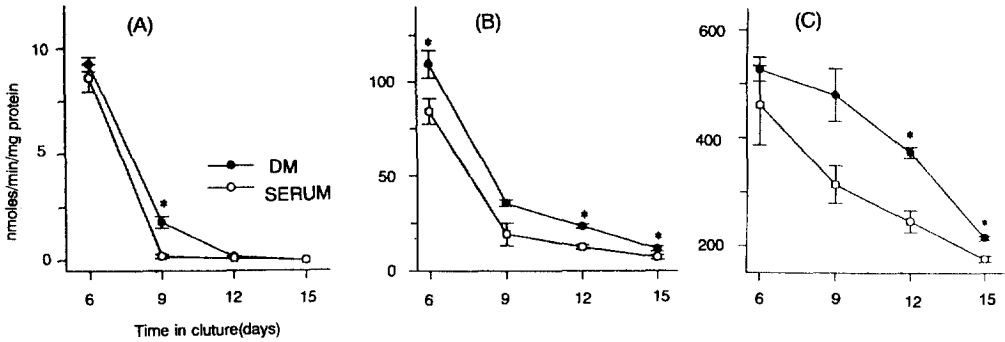


Fig 5. Time course for activities of brush border marker enzymes from renal proximal tubule cells grown in hormonally defined serum-free or 10% serum supplemented medium.

Panel A: alkaline phosphatase activity was determined by measuring the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate.

Panel B: leucine aminopeptidase activity was determined by measuring the hydrolysis of L-leucine-*p*-nitroanilide.

Panel C:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity was determined by assaying the release of *p*-nitroanilide from L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. See Materials and Methods for the details of these assays. Enzyme activities were determined on day 6, 9, 12, and 15 in triplicate dishes. Values were the average  $\pm$  SE. of three independent determinations (n=9). \*  $p < 0.05$  hormonally defined vs. serum.

전자현미경적 관찰 : 투사 전자현미경으로 관찰시 신선한 근위세뇨관의 미세용모는 조밀하고 길이가 길었으나 배양된 세포의 미세용모는 드문드문하고 길이가 짧았으며 편평하였다(Fig 4A). 혈청이나 호르몬을 첨가하여 배양된 세포에서 정상적인 연결복합체를 관찰할 수 있었고 미토콘드리아를 비롯한 세포 소기관들은 서로 유사하였다(Fig 4D). 그러나 슬변연의 미세용모는 현저한 차이를 보였는데 혈청을 첨가한 세포(Fig 4B)에 비해서 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포는 미세용모가 더 조밀하였다(Fig 4C). 주사 전자현미경 관찰에서도 비슷한 결과를 관찰할 수 있었다(Fig 4B & C).

혈청배지와 무혈청배지에서 초대배양된 근위세뇨관 세

Table 2. Enzyme activities of freshly isolated proximal tubule

Enzyme	Activity
Alkaline phosphatase	$26.89 \pm 2.50$ (nmoles <i>p</i> -nitrophenyl phosphate released/min/mg protein)
Leucine aminopeptidase	$229.83 \pm 61.65$ (nmoles <i>p</i> -nitroanilide released/min/mg protein)
$\gamma$ -glutamyl transpeptidase	$1634.26 \pm 92.69$ (nmoles <i>p</i> -nitroanilide released/min/mg protein)

Enzyme activities of brush border marker enzymes from freshly isolated renal proximal tubule. Values were the average  $\pm$  SE. of three independent determinations (n=9).

포의 슬변연 효소 활성과 단백질상의 비교 : Alkaline phosphatase(AP), leucine aminopeptidase(LAP) 그리고  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP)는 신장 근위세뇨관 슬변연의 전형적인 지표효소로서 신장 근위세뇨관의 활성도를 검사하는데 이용되는 효소들이다.

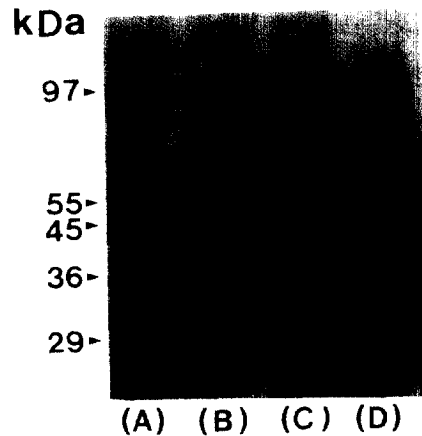


Fig 6. Gel electrophoresis of freshly isolated proximal tubule and primary cultured rabbit proximal tubule cell lysates. Primary cultured renal proximal tubule cells were grown in hormonally defined serum free, 5% or 10% serum supplemented medium. Tubules were prepared as described in Materials and Methods. (A): freshly isolated proximal tubule cells, (B): cells grown in hormonally defined serum-free medium, (C): cells grown in 5% serum-supplemented medium and (D): cells grown in 10% serum-supplemented medium.



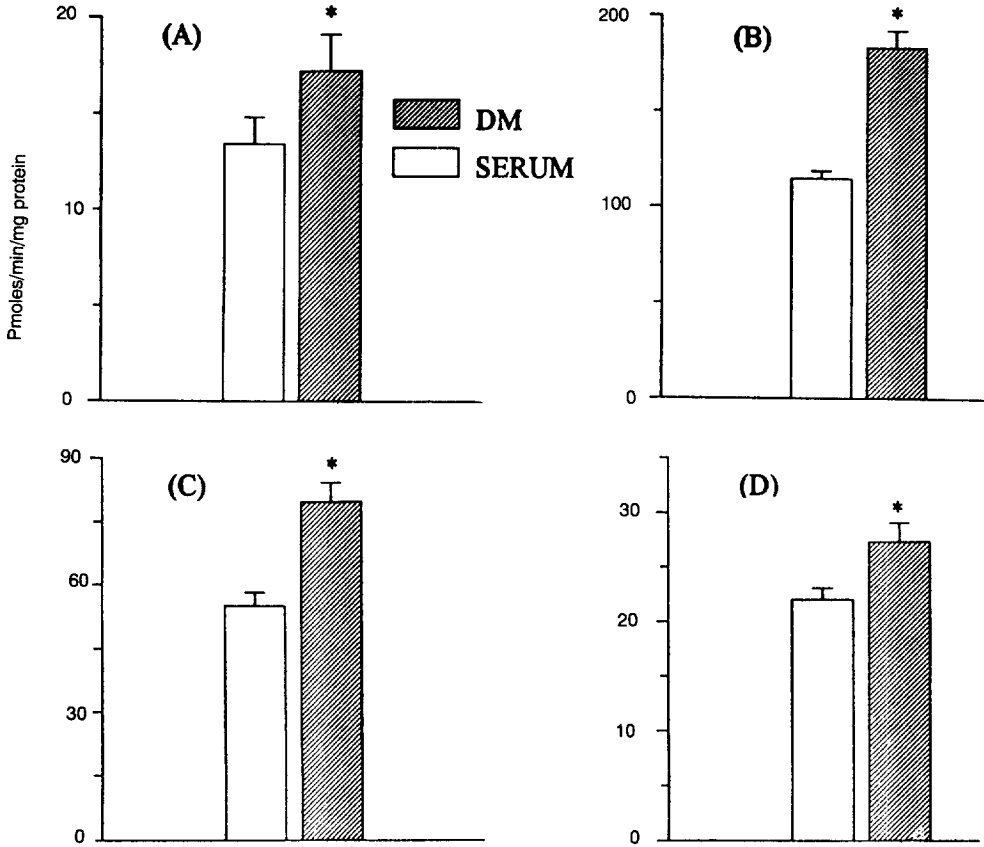


Fig 7. Comparison of <sup>14</sup>C-a-MG, <sup>32</sup>P, <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> and <sup>86</sup>Rb uptake in hormonally defined serum-free or 10% serum supplemented medium. Intact monolayers were utilized for uptake studies. Uptake were performed with <sup>14</sup>C-a-MG(0.5 $\mu$ Ci/ml), <sup>32</sup>P(0.5 $\mu$ Ci/ml), <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>(0.25 $\mu$ Ci/ml) and <sup>86</sup>Rb(1 $\mu$ Ci/ml) at 37 $^{\circ}$ C for 30 minutes, respectively. Uptake determinations were corrected for zero time uptake and standardized with respect to protein as described in Materials and Methods. Values were the average $\pm$ SE. of triplicate determinations(n=9). \* p < 0.05 hormonally defined vs. serum. (A): <sup>14</sup>C-a-MG uptake, (B): <sup>32</sup>P uptake, (C): <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> uptake, (D): <sup>86</sup>Rb uptake.

술변연에 위치한 AP, LAP,  $\gamma$ -GTP 효소들의 활성도를 측정된 결과 신선한 근위세뇨관에 비해 6일간 배양된 세포의 활성도는 각각  $65.59 \pm 0.86\%$ ,  $52.57 \pm 0.88\%$ ,  $67.76 \pm 0.75\%$ 로 감소하였다(Table 2). 그리고 세포배양기간이 경과함에 따라 AP, LAP의 활성도는 급격히 감소하였으나  $\gamma$ -GTP의 활성도는 완만하게 감소하였다(Fig 5). 배양 6일부터 9일 사이의 AP, LAP 및  $\gamma$ -GTP 활성도는 각각  $80.76 \pm 0.19\%$ ,  $67.39 \pm 0.76\%$ ,  $8.92 \pm 1.17\%$ 로 감소하였다. 또한 혈청을 첨가한 세포에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 효소 활성도가 유의성있게 높았다(p < 0.05). 호르몬 한정 무혈청 배지와 5%, 10% 혈청을 각각 첨가하여 배양된 세포의 단백질 양상은 차이를 나타내지 않았다(Fig 6).

혈청배지와 무혈청배지에서 초대배양된 근위세뇨관 세포의 기능 비교 : 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 신장 근위세뇨관 세포에서 술변연의 Na<sup>+</sup>/glucose 공동운반체(<sup>14</sup>C-a-MG)와 Na<sup>+</sup>/phosphate 공동운반체(<sup>32</sup>P) 그리고 Na<sup>+</sup> 운반체(<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>)와 기저막의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase(<sup>86</sup>Rb)의 활성도를 측정하였다.

술변연의 Na<sup>+</sup>/glucose 공동운반체의 활성도는 호르몬 한정 무혈청 배지와 혈청배지에서 각각  $17.25 \pm 1.92$ ,  $13.43 \pm 1.42$  pmoles/min/mg protein으로 측정되었다(Fig 7A). Na<sup>+</sup>/phosphate 공동운반체의 활성도는  $182.96 \pm 8.81$ ,  $113.92 \pm 4.21$  pmoles/min/mg protein(Fig 7B), Na<sup>+</sup> 운반체의 활성도는  $79.57 \pm 4.47$ ,  $55.06 \pm 3.23$  pmoles/min/mg protein

(Fig 7C), 기저막의  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 활성도는  $27.33 \pm 1.73$ ,  $21.97 \pm 1.04$  pmoles/min/mg protein으로 각각 측정되었다(Fig 7D). 이와같은 결과로 보아 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양한 세포의 물질이동 능력이 혈청에서 배양된 세포보다 높았다( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

신체의 각 기관을 구성하는 세포들의 성장과 기능은 세포의 기질, 세포 부착분자들과 세포사이의 연결복합체 등과 같은 인자들에 의해 영향을 받는다. 한편 배양된 세포에서 나타나는 기능의 변화는 대부분의 경우 세포의 배양 환경에 의해 영향을 받는다. 생체내에 정상적으로 존재하는 인자들에 관한 연구를 위해서 세포를 배양할 때는 혈청을 첨가하여 배양하면 곤란하다. 따라서 혈청을 첨가하지 않고 세포를 배양하는 방법이 개발되어 세포의 성장과 대사, 세포와 세포간의 상호작용 그리고 유전자 발현 등과 같은 특수한 연구에 이용되어지고 있다<sup>30</sup>. 이 실험에서는 신장 근위세뇨관 세포를 호르몬 한정 무혈청 배지나 혈청 배지에서 각각 배양하면서 성장을 비교하였다. 세포의 성장은 배양 6일째부터는 거의 대수적으로 증가하였으며 배양 후 6, 9, 12 그리고 15일에는 호르몬 한정 무혈청 배지에 비해 혈청배지에서 배양한 세포의 숫자가 현격히 증가하였다. Alco 등<sup>31</sup>은 세포수와 단백질량이 배양 3일까지는 급격히 증가하지 않았지만 4-8일이 경과하면 세포수와 단백질량이 거의 두배 이상으로 증가한다고 보고하였다. 이는 세포배양 환경 즉, 성장 첨가제의 종류와 농도 등의 차이에 기인한 것이라 생각되며 특히 혈청내에 존재하는 수많은 호르몬과 인자들 때문에 호르몬 한정 무혈청 배지 보다는 성장을 촉진시키는 것으로 생각된다. 그러나 섬유아세포를 과도증식시키는 단점이 있었다. 배양 후 15일부터 성장이 둔화되는 것은 세포가 완전히 단층을 형성한 후 세포 상호간에 자가억제작용에 기인한 것으로 생각된다.

초대배양된 근위세뇨관 세포를 전자현미경으로 관찰하면 미세용모는 배양배지쪽을 향하고 있고 기저막은 배양 접시에 부착되어 있다. 이 실험에서 신성하게 적출한 근위세뇨관의 미세용모는 길이가 길고 조밀하였으나 배양된 세포의 미세용모는 짧고 드문드문 하였다. 또한 이 결과는 혈청을 첨가하여 배양한 세포에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 솔변연 미세용모가 더 조밀하다는 보고<sup>32</sup>와도 일치하였다.

세포가 완전히 단층을 형성한 후에는 dome이 관찰되었는데 MDCK 세포에서 dome은 세포의 이온운반체가 활성화되어 세포단층과 배양접시 사이에 전해질이 저류되어 삼투압이 상승함으로써 형성되는 것으로 알려져 있다<sup>33</sup>. 이들 dome 또는 hemicyst는 세포의 이온수송 능력을 나타내는 것이며 세포 기능분화 정도의 지표가 되기도 한다<sup>34</sup>. 이와 같이 dome의 수와 크기는 세포를 통한 물질이동의 척도가 되므로 이를 측정하였는데 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양한 세포가 혈청배지에서 보다 dome의 출현빈도가 유의성 있게 높아, 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 물질이동 능력이 왕성함을 알 수 있었다. 이는 혈청내에 함유되어 있는 알려지지 않은 인자들에 의한 기능억제 및 섬유아세포의 과도한 성장으로 인한 근위세뇨관 세포의 상대적인 숫적 저하나 기능의 약화때문이라고 생각된다.

신장의 세뇨관에 존재하는 여러 효소들은 부위별로 분포와 활성이 다르기 때문에 이와같은 효소들은 신장 기능 연구의 지표로 사용되어진다. Alkaline phosphatase(AP), leucine aminopeptidase(LAP) 그리고  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)는 근위세뇨관 솔변연 그리고  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase 등은 기저막의 지표효소로 이용된다. 이 실험에서는 호르몬 한정 무혈청 배지와 혈청배지로 배양한 세포의 AP, LAP,  $\gamma$ -GTP 활성도를 세뇨관 접종 후 경시별로 비교하였는데 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양한 세포의 효소 활성도가 혈청배지에서 보다 높았고 시간이 경과함에 따라 효소의 활성도는 감소하였다. 초대배양한 토끼 근위세뇨관에서는 세포배양 6일이 경과하면 AP 활성도는 급속히 감소한 반면에  $\gamma$ -GTP는 배양기간 동안에 완만하게 감소한다고 보고하였다<sup>35</sup>. LLC-PK<sub>1</sub> 세포에서도 생체내의 근위세뇨관과 비교하면 이와같은 효소들의 활성도가 현저히 감소된다고 하였다<sup>36</sup>. 이는 혈청속에 존재하는 인자들이 섬유아세포의 과도증식 뿐만 아니라 솔변연에 존재하는 효소활성을 감소시킴을 의미한다. 하지만 어떠한 성분에 의해서 조절되는지는 아직 밝혀져 있지 않다. 그러므로 배지의 성분을 제한하는 호르몬 한정 무혈청 배지 등을 사용하여 연구되어야 할 것이다. 전기영동을 통해 호르몬 한정 무혈청 배지와 5%, 10% 혈청을 첨가하여 배양한 세포에서 단백질 양상의 차이는 관찰할 수 없었다(Fig 6). 혈청을 첨가한 배지에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양한 세포에서 29 kDa의 단백질량은 더 많았으나 35 kDa과 55 kDa은 더 적었다. 그러나 단백질량의 차이에 대한 구체적인 의미는 이 실험결과로는

알 수 없었다.

초대배양된 근위세뇨관 세포의 물질이동 능력을 알아보기 위해 호르몬 한정 무혈청 배지 또는 혈청배지로 배양된 세포의  $\text{Na}^+/\text{glucose}$  공동운반체,  $\text{Na}^+/\text{phosphate}$  공동운반체,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  상호운반체와  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 의 활성도를 비교하였다. 혈청을 첨가한 배지에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 활성도가 유의성있게 높게 나타나 혈청이 첨가되지 않은 세포의 물질이동 능력이 더 활발함을 알 수 있었다. 이는 dome 출현빈도에서 보여주는 결과와 일치하였다. 한편 혈청은 물질이동에 관련된 호르몬의 수용체를 하향조절하여 세포의 기능을 약화 또는 상실시킨다는 보고<sup>37</sup>가 있는 것으로 보아 혈청속에는 세포의 물질 이동계에 영향을 미치는 인자가 포함되어 있음을 시사해준다.

결론적으로 호르몬 한정 무혈청 배지에서 초대배양된 토끼 신장 근위세뇨관 세포는 10% 혈청을 첨가하여 배양한 세포에 비해 성장은 느렸으나 슬변연 효소 및 세포막 물질이동계의 활성도는 유의성 있게 높았다.

## 결 론

신장 근위세뇨관은 접종후 3일이 경과하면 colony가 형성하기 시작하여 colony들은 서로 연결되어 증식되고 15일이 경과하면 완전하게 단층을 형성하였다. 이때 세포 물질이동의 지표인 dome이 관찰되었고, 혈청을 첨가한 배지에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 dome 출현빈도가 더 높았다. 그리고 혈청을 첨가해 배양된 접시에서 섬유아 세포의 과도증식을 관찰할 수 있었다. 투사 전자현미경하에서 관찰시 신선한 근위세뇨관의 미세용모는 길이가 길고 조밀하였으나 배양된 세포의 미세용모는 짧고 드문드문 하였다. 혈청을 첨가하여 배양한 세포에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포의 미세용모가 더 조밀하였으며, 주사현미경하에서도 같은 소견을 보였다.

신장 근위세뇨관 세포의 슬변연쪽 지표효소인 alkaline phosphatase(AP), leucine aminopeptidase(LAP) 및  $\gamma\text{-glutamyl transpeptidase}(\gamma\text{-GTP})$ 의 활성도는 10% 혈청을 첨가한 배지에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 배양된 세포에서 더 높았다. 신선한 근위세뇨관에 비해 배양 6일째된 세포는 AP, LAP,  $\gamma\text{-GTP}$ 의 효소 활성도는 각각  $65.59 \pm 0.86\%$ ,  $52.57 \pm 0.88\%$ ,  $67.76 \pm 0.75\%$  감소하였다. 그리고 배양기간이

경과함에 따라 AP, LAP의 활성도는 급격히 감소하였으나,  $\gamma\text{-GTP}$ 의 활성도는 완만하게 감소하였다. 호르몬 한정 무혈청 배지와 5% 또는 10% 혈청을 첨가하여 배양된 세포의 단백질 양상은 차이가 없었다. 근위세뇨관 세포의 슬변연쪽  $\text{Na}^+/\text{glucose}$  공동운반체 ( $^{14}\text{C-a-MG}$ ),  $\text{Na}^+/\text{phosphate}$  공동운반체 ( $^{32}\text{P}$ ) 및  $\text{Na}^+$  운반체 ( $^{22}\text{Na}$ )와 기저막쪽의  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  ( $^{86}\text{Rb}$ )의 활성도는 혈청을 첨가한 세포에 비해 호르몬 한정 무혈청 배지에서 더 높았다.

이와같이 호르몬 한정 무혈청 배지에서 초대배양된 토끼 신장 근위세뇨관 세포는 10% 혈청을 첨가하여 배양한 세포에 비해 성장은 느렸으나 섬유아세포의 과도증식은 나타나지 않았다. 그리고 슬변연 효소 및 세포막 물질이동계의 활성도는 유의성 있게 높았다.

## 참 고 문 헌

1. 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.
2. Cheval L, Doucet A. Measurement of Na-K-ATPase-mediated rubidium influx in single segment of rat nephron. *Am J Physiol*, 259:F111-F121, 1990.
3. Handler JS, Perkins FM, Johnson JP. Studies of renal cell function using cell culture techniques. *Am J Physiol*, 238:F1-F9, 1980.
4. Taub M, Chuman L, Saier Jr MH, et al. Growth of Madin-Darby canine kidney epithelial cell (MDCK) line in hormone-supplemented, serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci*, 76:3338-3342, 1979.
5. Chuman L, Fine LG, Cohen AH, et al. Continuous growth of proximal tubular kidney epithelial cells in hormone-supplemented serum-free medium. *J Cell Biol*, 94:506-510, 1982.
6. Yanase M, Handler JS. Activators of protein kinase C inhibit sodium transport in A6 epithelia. *Am J Physiol*, 250:C517-C522, 1986.
7. Caverzasio J, Rizzoli R, Bonjour JP. Sodium-dependent phosphate transport inhibited by parathyroid hormone and cyclic AMP stimulation in an opossum kidney cell line. *J Biol Chem*, 268:3233-3237,

- 1986.
8. Malmstrom K, Murer H. Parathyroid hormone inhibits phosphate transport in OK cells but not in LLC-PK<sub>1</sub> and JTC-12·P<sub>3</sub> cells. *Am J Physiol*, 251:C23-C31, 1986.
  9. Misfeldt DS, Hamamoto ST, Pitelka DR. Trans-epithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci*, 73:1212-1216, 1976.
  10. Mullin JM, Weibel J, Diamond L, et al. Sugar transport in the LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cell line: Similarity to mammalian kidney and the influence of cell density. *J Cell Physiol*, 104:375-389, 1980.
  11. Lever JE. Expression of Differentiated Functions in Kidney epithelial cell lines. *Mineral Electrolyte Metab*, 12:14-19, 1986.
  12. Tang MJ, Suresh KR, Tannen RL. Carbohydrate metabolism by primary cultures of rabbit proximal tubules. *Am J Physiol*, 256:C532-C539, 1989.
  13. Woodhall PB, Tisher CC, Simonton CA, et al. Relationship between para-aminohippurate secretion and cellular morphology in rabbit proximal tubules. *J Clin Invest*, 61:1320-1329, 1978.
  14. Becker JH, Willis JS. Properties of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in primary cultures of kidney cells. *J Cell Physiol*, 99: 427-440, 1979.
  15. Chung SD, Alavi N, Livingston D, et al. Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J Cell Biol*, 95:118-126, 1982.
  16. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, et al. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem*, 27:317-325, 1985.
  17. Alavi N, Spangler RA, Jung CY. Sodium-dependent glucose transport by cultured proximal tubule cells. *Biochem Biophys Acta*, 899:9-16, 1987.
  18. Cheung PT. and Hammerman MR. Na<sup>+</sup>-independent D-glucose transporter in rabbit renal basolateral membranes. *Am J Physiol*, 254:F711-F718, 1988.
  19. Fine LG, Badie-Dezfooly B, Lowe AG, et al. Stimulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport is an early event in hypertrophy of renal proximal tubular cells. *Proc Natl Acad Sci*, 82:1736-1740, 1985.
  20. Waqar MA, Seto J, Chung SD, et al. Phosphate uptake by primary renal proximal tubule cell cultures grown in hormonally defined medium. *J Cell Physiol*, 124:411-423, 1985.
  21. Cook WF, Pickering GW. A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature*, 182:1103-1104, 1958.
  22. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*, 164:321-329, 1946.
  23. Green MN, Tsou KC, Bressler R, et al. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl-β-naphthylamide hydrochloride. *Arch Biochem Biophys*, 57:458-474, 1955.
  24. Tate SS. and Meister A. Interaction of γ-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J Biol Chem*, 249:7593-7602, 1974.
  25. 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.
  26. Sakhiani LM, Badie-Dezfooly B, Trizna W, et al. Transport and metabolism of glucose by renal proximal tubular cells in primary culture. *Am J Physiol*, 246:F757-F764, 1984.
  27. Rabito CA. Phosphate uptake by a kidney cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *Am J Physiol*, 245:F22-F31, 1983.
  28. Rindler MJ, Taub M, Saier Jr MH. Uptake of <sup>22</sup>Na by cultured dog kidney cells (MDCK). *J Biol Chem*, 254:11431-11439, 1979.
  29. Devis PE, Grohol SH, Taub M. Dibutyryl cyclic AMP resistant MDCK cells in serum free medium have reduced cyclic AMP dependent protein kinase activity and a diminished effect of PGE<sub>1</sub> on differentiated function. *J Cell Physiol*, 125:23-35, 1985.
  30. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*,

- 64:271-280, 1991.
31. Aleo MD, Taub ML, Nickerson PA, et al. Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells : I. Growth and biochemical characteristics. *In Vitro*, 25: 776-783, 1989.
  32. Ronco P, Antoine M, Baudouin B, et al. Polarized membrane expression of brush-border hydrolases in primary cultures of kidney proximal tubular cells depends on cell differentiation and is induced by dexamethasone. *J Cell Physiol*, 145:222-237, 1990.
  33. Taub M. Importance of hormonally defined, serum-free medium for *in vitro* studies concerning epithelial transport. Tissue culture of epithelial cells, Plenum publishing corporation, 255-280, 1985.
  34. Taub M. The biology of cultured cells. *Fundamentals of Medical Cell Biology*, 6:323-345, 1992.
  35. Toutain H, Vauclin-Jacques N, Fillastre JP. Biochemical, functional, and morphological characterization of a primary culture of proximal tubule cells. *Instrumental Cell Res*, 194:9-18, 1991.
  36. Yoneyama Y, Lever JE. Induction of microvillar hydrolase activities by cell density and exogenous differentiation inducers in an established kidney epithelial cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *J Cell Physiol*, 121:64-73, 1984.
  37. Taub M. The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxic in Vitro*, 213-225, 1990.
-