

신장 허혈이 토끼 신피질 절편에서 아미노산 이동에 미치는 영향

남 윤 정 · 김 주 헌

경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소
(1996년 7월 23일 접수)

Effect of renal ischemia on amino acid transport in rabbit renal cortical slices

Yun-jeong Nam, Joo-heon Kim

College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Medicine Gyeongsang National University
(Received Jul 23, 1996)

Abstract : This study was carried out to determine the effect of renal ischemia on amino acid transport in rabbit renal cortical slices. The animal models of renal ischemia induced experimentally by clamping the renal artery. These results were summarized as follows:

1. The uptake of amino acids lysine and α -aminobutyrate(AIB), dicarboxylate succinate and organic anion PAH in cortical slices was normal or increased after 30 or 60 min of ischemia *in vivo*.

2. In a 30 min ischemic kidney, the slice uptake of amino acids was returned to the control level by 30 min of reflow. In a 60 or 90 min ischemic kidney, the lysine uptake was returned to the control level after of reflow, but the uptake of AIB and succinate was significantly reduced during reflow period of 30-120 min.

3. Oxygen consumption in cortical slices was increased after 30 min of ischemia but was not altered by 60 min of ischemia.

This results indicate that transient ischemia caused increasing of amino acid uptake in renal cortical slices without metabolic disorder of renal proximal tubule.

Key words : amino acid, renal ischemia, renal cortical slice, oxygen consumption.

서 론

급성신부전증은 허혈성 신부전증과 nephrotoxine에 의

한 신부전증이 가장 보편적인 원인으로 알려져 있다¹. 이 중 허혈성 신부전증은 신혈류량의 감소에 의해 발생되므로 이 연구를 위해서는 실험적으로 신동맥을 일시적으로 차단하는 방법이 간단하면서도 혈류를 정확히

차단시킬 수 있으므로 많이 쓰이고 있다².

허혈성 신부전시 나타나는 형태학적 변화는 근위세뇨관이 가장 민감하게 손상받지만^{3,5} 이 손상은 혈류를 재유통시키면 거의 회복된다고 보고되었다⁴. 또한 허혈성 신부전시 신기능의 변화는 사구체 여과율의 감소⁶⁻⁸, Na⁺ 배설의 증가^{3,9} 및 포도당 재흡수 장애^{4,10} 등이 나타난다고 보고되었으며 Paddock *et al*¹¹은 혈류를 재유통시켰을 때 세포의 형태와 효소활성은 정상으로 회복되지만 물질이동 기능은 정상적으로 회복되지 않는다고 하였다.

아미노산은 정상적인 신장의 근위세뇨관에서 brush border membrane과 basolateral membrane을 통해 Na⁺과 co-transport하여 재흡수된다고 여러 연구자들에 의해 밝혀져 있다^{8,12-14}. 그러나 허혈성 신부전시 근위세뇨관에서 아미노산 이동의 변화에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 신장기능 연구에 가장 많이 사용되고 있는 토끼의 신장을 실험적으로 허혈성 신부전을 유발시켜 근위세뇨관의 basolateral membrane측에서 물질이동만을 측정할 수 있는 신피질 절편을 이용하여 허혈시 근위세뇨관에서 아미노산 이동의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 성별 구별없이 임상적으로 건강하다고 인정되는 1.5~2.5kg의 New Zealand White종 토끼를 사용하였으며 ketamine(25mg/kg)과 xylazine(5mg/kg)으로 근육주사하여 마취한 후 복강을 열고 적당한 시간동안 신동맥을 결찰시킨 신장과 결찰후 혈류를 재유통시킨 신장을 토끼로부터 적출하였다.

신피질 절편의 제작 : 적출한 신장은 피막을 벗긴후 산소를 공급하면서 약 4℃로 냉각시켜둔 등장성 식염수(130mM NaCl, 4mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.4)로 옹기 다음, 이 용액을 신동맥내로 관류시켜 신장내 혈액을 제거하였다. 그후 Stadie-Riggs microtome을 이용하여 0.4~0.5mm 두께의 신피질 절편을 만들었다.

신피질 절편에서 아미노산 이동량의 측정 : 4ml의 Cross-Taggart 용액(130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 7.8)과 미량의 ¹⁴C-PAH, ¹⁴C-succinate, ¹⁴C-AIB(*a*-aminoisobutyrate) 및 ¹⁴C-lysine이 들어 있는 각각의 용기속에 2개씩(약 50mg)의 신피질 절편을 넣고 25℃하에서 100% 산소를 계속 공급하면서 1시간 동안 incubation 하였다. Incubation시킨 후 용액속의 신피

질은 들어내어 여과지 위에서 물기를 제거하고 각각의 무게를 잰 다음, 1N NaOH와 HCl를 넣어 중화시킨 후 liquid scintillation counter(Tri-carb 300C, Packard)를 사용하여 신피질 절편과 incubation 용액내 방사성 동위원소 농도에 대한 용액내의 농도비 즉, S/M비(slice to medium ratio)로 나타내었다.

산소소모량의 측정 : 신피질 절편의 산소 소모량은 Kim 등의 방법^{15,16}에 따라 Clark-type electrode를 이용하여 oxygen monitor(model 53, Yellow Sping Instrument Co.)로 측정하였다. 37℃하에서 3ml의 Cross-taggart 용액이 담긴 반응용기 내에 100% 산소를 충전시킨 후 약 100mg 정도의 절편을 incubation시켜 산소분압의 감소로서 측정하였다.

통계처리 : 실험결과들은 mean±SE로 나타내었고, 통계학적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 검정하였으며 P값이 0.05 미만인 것을 유의한 것으로 하였다.

결 과

신피질 절편을 이용한 실험은 basolateral membrane에서 아미노산 이동에 대한 허혈의 효과를 관찰하고자 실시한 것으로 Fig 1은 신피질 절편에서 아미노산인 lysine과 *a*-aminoisobutyrate (AIB), krebs cycle 대사산물인 succinate 그리고 유기 음이온인 PAH의 허혈시간에 따른 측정정도를 나타낸 것이다. Lysine의 경우 30분과 90분 허혈시 각각 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈으며, 60분 허혈시에도 유의하지는 않으나 그 이동량이 증가하는 양상을 보였다. AIB는 30분, 60분 허혈시 유의한 증가를 보였으나 90분간 허혈시는 대조군에 비해 약 43% 감소하였다. 이와같은 증가현상이 다른 유기물질의 이동에서도 나타나는지를 알아보기 위하여 succinate와 PAH의 이동을 관찰한 결과 succinate는 30분과 60분간 허혈시켰을 때 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 90분간 허혈시켰을 때에는 유의한 감소를 보였다. PAH도 30분과 60분 허혈시 각각 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나 90분 허혈시에는 유의한 감소를 나타내었다.

이와같은 결과로 볼 때 신장에서 30분 및 60분간 허혈시켰을 때 아미노산 이동의 증가가 아미노산에서 뿐만 아니라 다른 유기물질들의 이동에서도 나타나는 현상임을 알 수 있었고, 60분까지 허혈시켜도 basolateral membrane을 통한 유기물질의 이동은 억제되지 않음을 알 수 있었다.

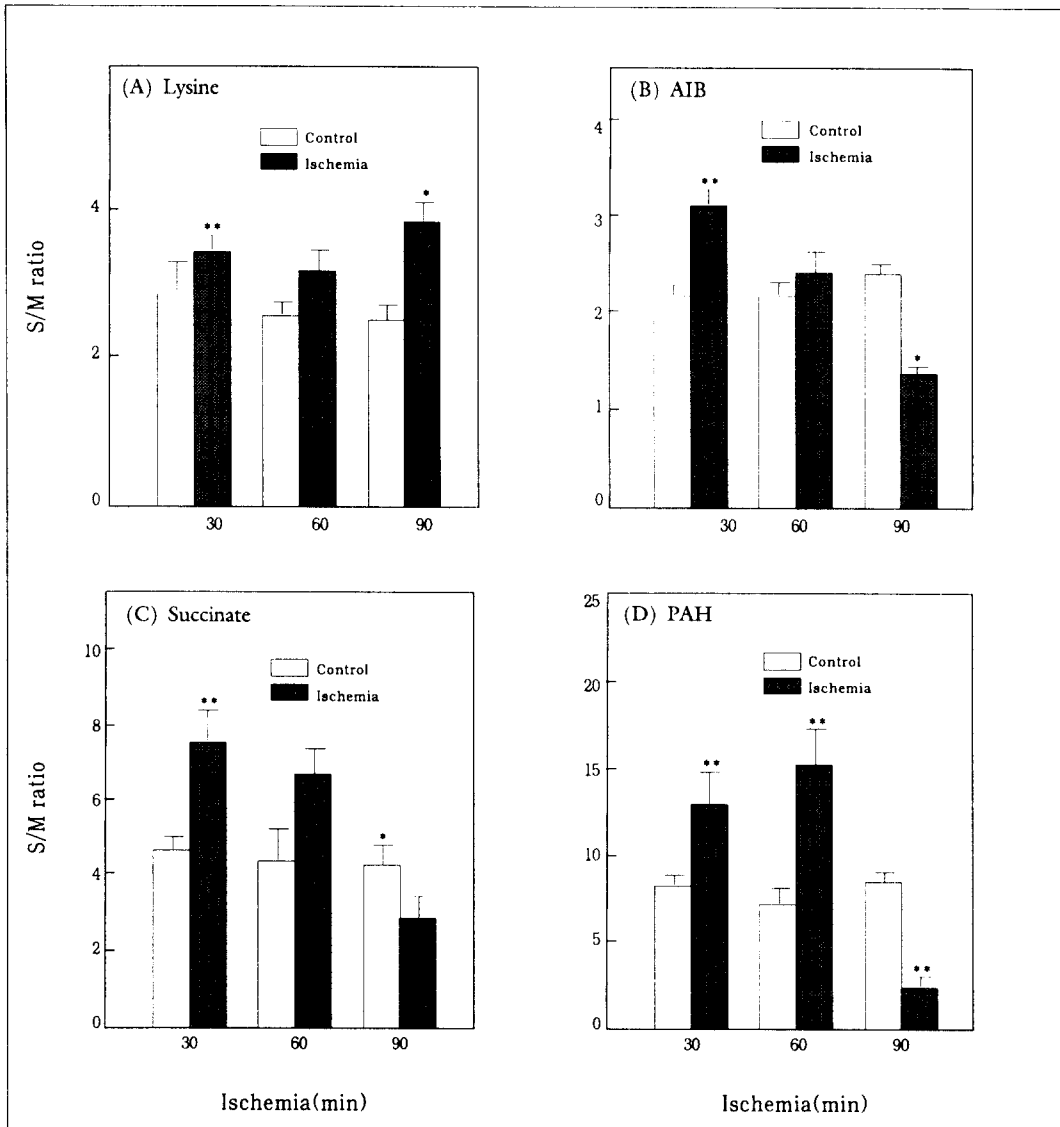


Fig 1. Alterations in accumulation of lysine, α -aminoisobutyrate(AIB), succinate, PAH in renal cortical slices obtained immediately after 30-, 60- and 90-min ischemia. The slices were incubated at 25°C for 60 min in Cross-Taggart medium. Data are the Mean \pm SE of six experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the respective control.

Fig 2는 30분간 신동맥을 결찰한 후 결찰을 풀고 30분간 혈류를 다시 재유통시켰을 때 신피질 절편에서 유기 물질의 이동변화를 나타낸 결과인데 30분 허혈시 lysine,

AIB 및 succinate가 대조군에 비해 각각 34, 43, 63% 증가되었던 값이 30분 결찰후 30분간 혈류를 재유통시켰을 때 모두 대조군값까지 회복되었다.

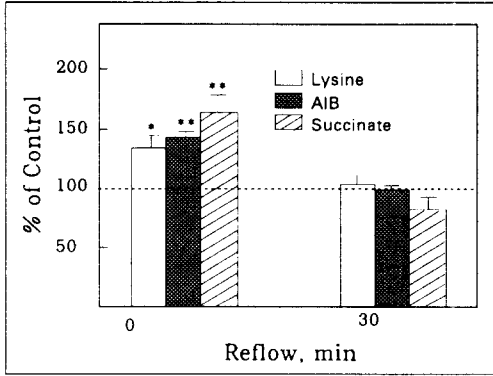


Fig 2. Effect of reflow after a 30-min ischemia on accumulation of lysine, AIB and succinate in renal cortical slices. The slices were incubated at 50°C for 60 min in Cross-Taggart medium. Data are the mean ± SE of four experiments. * p<0.05, ** p<0.01 compared with the respective control.

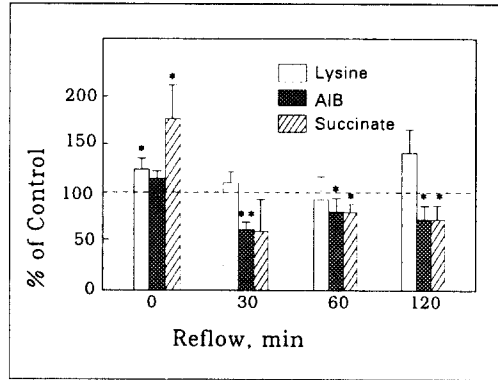


Fig 3. Effect of reflow after a 60 min ischemia on accumulation of lysine, AIB and succinate in renal cortical slices. The slices were incubated at 25°C for 60 min in Cross-Taggart medium. Data are the mean ± SE of three experiments. * p<0.05, ** p<0.01 compared with the respective control.

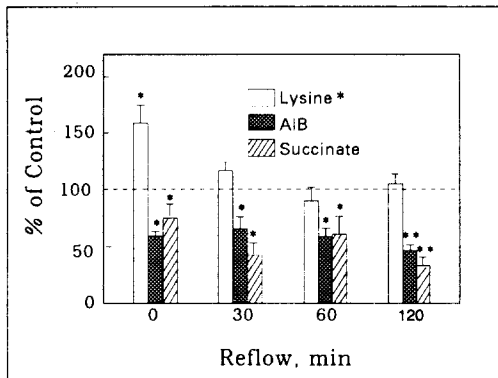


Fig 4. Effect of reflow after a 90 min ischemia on accumulation of lysine, AIB and succinate in renal cortical slices. The slices were incubated at 25°C for 60 min in Cross-Taggart medium. Data are the mean ± SE of three experiments. * p<0.05, ** p<0.01 compared with the respective control.

Fig 3은 60분간 허혈시킨 후 30분에서 120분간 혈류를 재유통시켰을 때 물질이동을 관찰한 결과로써 lysine은 60분간 허혈시켰을 때 대조군과 거의 비슷하게 회복되었으며, 120분동안 계속 혈류를 재유통시켰을 때에도 대조군에 비해 유의한 변화를 보이지 않았다. 그러나 AIB와 succinate는 60분 허혈후 30분에서 120분 동안 혈류를 재유통시켰을 때 그 이동량이 오히려 유의한 감소를 나타냈다.

Fig 4는 90분간 허혈시킨 후 혈류를 재유통시켰을 때의

물질이동을 관찰한 결과로 lysine의 경우 90분 허혈시 대조군에 비해 약 60% 정도 증가되었던 값이 30분간 혈류를 재유통시켰을 때 거의 정상으로 회복되었지만 AIB와 succinate는 허혈에 의해 감소되었던 이동량이 120분 동안 혈류를 재유통시켰을 때 각 물질의 이동계가 서로 다르게 영향을 받고 있음을 추측할 수 있었다.

Table 1은 신피질 절편에서 산소 소모량을 측정된 결과를 나타낸 것으로 30분간 허혈시켰을 때 허혈시킨 신피질 절편의 산소 소모량이 대조군의 값보다 유의한 증가를 나타내었으나 60분 허혈시에는 대조군과 허혈시킨 신피질 절편간에 유의한 차이가 없었다. 이와같은 결과는 60분까지 허혈시켜도 근위세뇨관세포의 대사기능은 손상받지 않았음을 가르킨다.

Table 1. Effect of ischemia on oxygen consumption in renal cortical slices

Ischemia time (min)	Control ($\mu\text{l O}_2/\text{mg}/\text{min}$)	Ischemia ($\mu\text{l O}_2/\text{mg}/\text{min}$)
30	20.33 ± 2.60	37.46 ± 3.80*
60	19.31 ± 2.23	20.36 ± 2.22

Oxygen consumption was measured in a medium containing 130mM NaCl, 100mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM Na acetate and 20mM Tris/HCl(pH 7.8). Values are the mean ± SE of ten experiments.

* p<0.05 compared with the respective control.

고 찰

신피질 절편에서 아미노산(lysine, α -aminoisobutyrate)의 이동은 30분동안 혈류를 차단시킨 신장에서는 모두 유의한 증가를 보였다. 그러나 90분간 허혈시에는 lysine은 증가하였으나 AIB는 현저한 감소를 보임으로써 아미노산의 종류에 따라 그 이동량이 서로 다르게 나타남을 알 수 있었다. 본 실험에서 다른 유기물인 PAH, succinate도 30분과 60분 허혈시 그 이동량이 현저히 증가하는 것으로 보아 허혈된 신피질 절편에서 아미노산 이동의 증가는 아미노산에서만 나타나는 특이한 현상이 아님을 알 수 있었으며, Reimer *et al.*^{17,18}도 60분간 허혈시킨 쥐의 신피질 절편에서 PAH 이동이 현저히 증가함을 보고하였다. 그러나 Reimer¹⁹는 쥐의 신장에서 60분동안 허혈시켰을 때 근위세뇨관의 구조가 비가역적인 손상을 받았다고 보고하였으나 본 실험에서는 60분동안 허혈시킨 후에도 신피질 절편에서 여러 유기물질의 이동이 억제되지 않았는데 이 결과는 매우 흥미있는 것으로 사료된다. 이러한 허혈시 물질이동의 증가기전에 대해서는 아직 정확히 알려진 것이 없으나 몇가지 가능성은 추측해볼 수 있다. 즉, 신피질 절편에서 아미노산의 이동이 능동적 과정이기 때문에 근위세뇨관세포 자체의 대사가 증가하거나 대상적으로 아미노산 이동계의 합성이 증가되면 아미노산의 이동도 증가하게 될 것이다. 실제로 허혈된 근위세뇨관에서 세포막의 투과성 증가로 인해 세포내 Na^+ 농도가 증가하고 K^+ 농도는 감소하여 Na-K-ATPase의 활성도가 증가하는 것으로 보고된 바 있다¹⁷. 그래서 본 실험에서 얻어진 허혈시킨 신피질 절편에서의 아미노산 이동의 증가가 근위세뇨관 세포의 에너지대사의 변화에 의한 것인지를 알아보기 위해 산소 소모량을 측정한 결과, 30분간 허혈시킨 신피질 절편에서는 산소 소모량이 증가하였으나 60분동안 허혈시킨 신피질절편에서는 아미노산의 이동량이 현저하게 증가했음에도 불구하고 산소 소모량은 대조군과 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 Randall²⁰이 60분간 허혈시킨 개의 신피질 절편에서 산소 소모량은 변화가 없었다고 보고한 것과 쥐에서 Berndt²¹는 60분, Reimer¹⁸는 90분간 허혈시켜도 산소 소모량에는 변화가 없었다고 보고한 것과 일치하였다. 이와같은 결과는 60분까지 허혈시켰을 때 *in vivo* 상태에서는 요의 농축능력이 감소되었다라도 근위세뇨관세포에 있는 아미노산 이동의 증가가 근

위세뇨관세포의 대사증가에 의한 것이 아님을 가르킨다. 또 다른 가능성인 허혈된 신장에서 대상으로 아미노산 이동계 합성의 증가는 Cohen *et al.*²²이 gentamicin을 처리한 쥐의 신장에서 PAH 이동계의 합성이 증가됨을 보고한 바 있다. 만약 본 실험에서 나타난 허혈시 아미노산 이동의 증가가 basolateral membrane에 있는 아미노산 이동계들의 합성이 허혈된 신장에서 대상으로 증가되었다고 추측할 수 있으나 신피질을 이용한 실험에서는 이것을 관찰할 수 없기 때문에 차후 이 문제는 vesicle 이용한 실험에서 더 연구해야 할 것으로 생각된다. 최근에는 신장 근위세뇨관세포의 basolateral membrane에서 PAH가 α -ketoglutarate와 같은 카복실산들과 교환하는 음이온 교환기전에 의해 이동되는 것으로 알려졌다²³ 허혈에 의해 세포내 축적된 대사산물들이 이러한 음이온 교환기전을 자극하여 PAH 이동을 증가시킬 가능성이 높다. 그러나 PAH 이동에서와 같이 아미노산의 이동도 basolateral membrane에서 음이온 교환기전에 의해 이동하는지는 알려지지 않았다. 그러므로 허혈된 신피질 절편에서 아미노산 이동이 억제되기 보다 오히려 증가하는 기전에 대해서는 앞으로 더욱 추구해 보아야 밝혀질 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서는 60분동안 허혈시켜도 basolateral membrane을 통한 유기물질의 이동이 저해되지 않는다는 것을 분명히 알 수 있다.

30분간 혈류를 차단시킨 후 다시 혈류를 재유통시켰을 때 lysine, AIB 및 succinate 모두 30분간 재유통시켰을 때에는 거의 정상으로 회복된 반면 60분간 허혈시킨 후 혈류를 재유통시켰을 때에는 lysine만 정상으로 회복되었을 뿐, AIB와 succinate는 2시간동안 혈류를 재유통시켜도 이동량이 오히려 감소하였다. 이와같은 결과는 허혈 후 혈류의 재유통시 각 물질의 이동계가 서로 다르게 영향을 받고 있음을 나타내고 있다. 또한 90분간 허혈시킨 신장에서 나타난 AIB, PAH 및 succinate 이동의 감소가 허혈후 2시간동안 혈류를 재유통시켜도 회복되지 않는 것으로 보아 이들 이동계가 90분 허혈시에는 비가역적인 손상을 받았음을 추측할 수 있다.

AIB와 succinate의 경우 허혈시킨 후 혈류를 재유통시켰을 때 오히려 그 이동이 감소하였는데 본 실험의 결과로서는 그 원인을 정확히 알 수 없었다. 그러나 허혈 자체보다 허혈후 혈류의 재유통으로 인해 여러 장기의 기능장애가 더욱 촉진되는 것으로 알려져 있는데²⁴, 이는 혈류의 재유통시 발생하는 oxygen free radical이 관여할

것으로 주장되고 있다. 하지만 신장에서는 oxygen free radical이 혈류의 재유통시 기능장애에 관여하는지는 의견이 일치하지 않는데 Paller와 Neumann²⁵는 쥐의 근위세뇨관 상피세포가 허혈후 혈류량의 재유통시 oxygen free radical에 의해 손상을 받는다고 보고한 반면, Gamelin과 Zager²⁶는 쥐에서 oxygen free radical이 허혈후 재유통시 나타나는 기능적, 형태적 변화에 어떠한 영향도 미치지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서 허혈후 혈류를 재유통시켰을 때 lysine과 AIB, succinate의 이동변화가 서로 다르게 나타났기 때문에 혈류의 재유통시 나타난 AIB와 succinate의 이동량 감소가 oxygen free radical로 인해 나타났는지는 정확히 알 수 없으며 이는 앞으로 더욱 추구해 보아야 밝혀질 것으로 사료된다.

결 론

신장 근위세뇨관에서 허혈이 아미노산 이동에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 허혈을 시킨 토끼 신피질 절편을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결론은 얻었다.

1. 신피질 절편에서 아미노산인 lysine과 α -aminobutyrate, 카복실산인 succinate, 유기음이온인 PAH의 축적은 30분이나 60분 허혈후에 대조군보다 억제되기보다 오히려 증가하였다.

2. 30분간 허혈시킨 신장에서 허혈후 30분동안 혈류를 재유통시켰을 때 신피질 절편에서 아미노산의 이동이 대조군의 신장과 차이가 없었고, 60분과 90분동안 허혈후 혈류를 재유통시켰을 때 lysine 이동은 정상이었으나 AIB와 succinate의 이동은 억제됨으로써 아미노산의 이동이 허혈시 이동계에 따라 서로 다르게 영향을 받는 것으로 나타났다.

3. 신피질 절편에서의 산소 소모량은 30분 허혈시 증가했으나 60분 허혈시에는 변화가 없었다.

이와같은 결과로 볼 때 허혈시 *in vivo*에서 나타나는 근위세뇨관에서의 아미노산 재흡수 억제는 basolateral membrane측의 흡수장애에 의한 것도 아니었으며, 근위세뇨관 자체의 대사장애로 나타나는 현상도 아니었음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Levinsky NG, Alexander EA. Acute renal failure. In: Brenner BM and Rector FC(ed) : The kidney. *Philadelphia: Saunders*, 806-856, 1976.
2. Stein JH, Lifshitz MD, Barnes LD. Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure. *Am J Physiol*, 243 : F172-F181, 1978.
3. Herminghuysen D, Welboure CJ, Welboure TC. Renal sodium reabsorption, oxygen consumption and γ -glutamyl transferase excretion in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol*, 248 : F804-F809, 1985.
4. Jonston PA, Rennke H, Levinsky NG. Recovery of proximal tubular function from ischemic injury. *Am J Physiol*, 241 : F28-F33, 1981.
5. Venkatachalam MA, Bernard DB, Konohoe JE, et al. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: difference among the S1, S2 and S3 segment. *Kid Int*, 14 : 31-49, 1978.
6. Friedman SM, Johnson RL, Friedman CL, et al. The pattern of recovery of renal function following renal artery occlusion in the dog. *Circ Res*, 2 : 231-235, 1954.
7. Jorgensen KE, Sheikh MI. Renal transport of neutral amino acid : cation-dependent uptake of L-alanine by liminal membrane vesicles. *Biochem J*, 248 : 533-538, 1987.
8. Bird JE, Mihoan K, Wilson CB, et al. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat. *J Clin Invest*, 81 : 1630-1638, 1988.
9. Joo WS, Nam YJ, Jung NG, et al. Effect of renal cortical slices. *Kor J Physiol*, 25 : 171-177, 1991.
10. Spiegel DM, Wilson PD, Molitoris BA. Epithelial polarity following ischemia: a requirement for normal cell function. *Am J Physiol*, 397 : 106-113, 1989.
11. Paddock JK, Land W. Lowenstein. Regeneration of the brush border after renal ischemia in rats. *Am J Physiol*, 241 : F28-F33, 1981.
12. Aronson PS, Sactor B. The Na^+ gradient-dependent transport of D-glucose in renal brush border membranes. *J Biol Chem*, 250 : 6031-6039, 1975.
13. Sacktor B. Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal

- basolateral membrane vesicle. *J Membr Biol*, 60 : 63-71, 1981.
14. Schwab SJ, Hammerman MR. Na⁺ gradient-dependent glycine uptake in basolateral membrane vesicle from the dog kidney. *Am J Physiol*, 249 : F338-345, 1985.
 15. Kim YK, Lee SH, Goldinger JM, et al. Effect of ethanol on organic ion transport in rabbit kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, 86 : 411-420, 1986.
 16. Kim YK, Park YS, Lee SH. Effect of harmaline on organic ion transport in rabbit renal cortical slices. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 294 : 259-272, 1988.
 17. Reimer KA, Jennings RB. Alterations in renal cortex following ischemic injury. I. PAH up take by slices of cortex after ischemia or autolysis. *J Clin Invest*, 25 : 176-184, 1971.
 18. Reimer KA, Jennings RB. Alterations in renal cortex following ischemic injury. II. PAH uptake, O₂ consumption and water content in slices of cortex after ischemis or autolysis. *J Clin Invest*, 25 : 185-195, 1971.
 19. Reimer KA, Ganote CE, Jennings RB. Alterations in renal coterx following ischemic injury. III. Ultrastructure of proximal tubules after ischemia or autolysis. *J Clin Invest*, 26 : 347-363, 1972.
 20. Randall HM. Effect of acute renal ischemia on aerobic metabolism of dog kidney homogenates. *Am J Physiol*, 217 : 1413-1418, 1969.
 21. Berndt WO. Effects of acute anoxia in renal transport processes. *J Toxicol Environm Health*, 2 : 1-11, 1976.
 22. Cohen L, Lapkin R, Kaloyanides G. Effect of gentamicin on renal function in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 193 : 264-273, 1975.
 23. Prichard JB, Miller DS. Comparative insights into the mechanisms of renal organic anion and cation secretion. *Am J Physiol*, 261 : R1329-1340, 1991.
 24. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *Engl J Med*, 312 : 159-163, 1981.
 25. Paller MS, Neumann TV. Reactive oxygen species and epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, 40 : 1042-1049, 1991.
 26. Gamelin LM, Zager RA. Evidence against oxidnat injury as a cretical mediator of post-ischemic acute renal failure. *Am J Physiol*, 255 : F450-F460, 1988.