J. Biomed. Lab. Sci. 8 (2002) 251-256

Role of Lipid Peroxidation on H_2O_2-Induced Renal Cell Death in Cultured Cells and Freshly Isolated Cells

Soon-Hee Jung†

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

This study was undertaken to determine the underlying mechanisms of reactive oxygen species-induced cell injury in renal epithelial cells and whether there is a difference in the role of lipid peroxidation between freshly isolated renal cells and cultured renal cells. Rabbit renal cortical slices were used as a model of freshly isolated cells and opossum kidney (OK) cells as a model of cultured cells. Cell injury was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release in renal cortical slices and trypan blue exclusion in OK cells. H_2O_2 was used as a drug model of reactive oxygen species. H_2O_2 induced cell injury in a dose-dependent manner in both cell types. However, renal cortical slices were resistant to H_2O_2 approximately 50-fold than OK cells. H_2O_2-induced cell injury was prevented by thiols (glutathione and dithiothreitol) and iron chelators (deferoxamine and phenanthroline) in both cell types. H_2O_2-induced cell injury in renal cortical slices was completely prevented by antioxidants N,N-diphenyl-p-phenylenediamine and Trolox, but the cell injury was not affected by these antioxidants in OK cells. H_2O_2 increased lipid peroxidation in both cell types, which was completely inhibited by the antioxidants. These results suggest that H_2O_2 induces cell injury through a lipid peroxidation-dependent mechanism in freshly isolated renal cells, but via a mechanism independent of lipid peroxidation in cultured cells.

Key Words: H_2O_2-induced cell injury, Renal cortical slices, LDH release, Rabbit

서 론

반응성산소기들 (유해산소; reactive oxygen species)은 신장에서 허혈성 급성신부전, 항생제나 독성물질에 의해 유발되는 급성신부전 및 사구체신염 등과 같은 여러 급성 및 만성 신장질환을 일으키는 원인으로 인정되고 있다[12,18,19]. 정상적인 조건에서 산소를 소모하는 모든 세포는 미토콘드리아에서 대사과정 중에 대사되는 산소의 약 2~5%가 superoxide나 H_2O_2와 같은 반응성산소기들로 전환된다. 그러나 세포들은 이들을 분해하는 효소나 물질들을 가지고 있어 그 독성으로부터 세포를 보호하고 있다[5,14]. 반응성산소기가 어떤 기전으로 세포손상을 유발시키는 지에 대해서는 명백하게 밝혀져 있지 않다.

반응성산소기들은 지질, 단백질 및 DNA 등 세포의 여러 구성성분을 공격할 수 있지만 생체막은 면적이 넓고 불포화 지방산을 많이 함유하고 있기 때문에 반응성산소기들에 의해 쉽게 공격을 받아 지질의 과산화가 발생되게 되는데[4], 지질의 과산화가 일어나게 되면 세포막의 투과성이 증가되고[2,4], 세포의 기능이 저해되어 결국에는 세포가 사망까지 이르게 된다.

그러나 지질의 과산화가 반응성산소기들에 의한 세포사망에 직접적인 원인이 되는 지에 대해서는 일치된 의견들을 보이지 않고 있다. 신피질 절편을 이용한 실험에서 반응성산소기에 의한 세포손상이 지질의 과산화와 연관되어 있지 않으며[6], 유사한 실험결과가 배양된 신장세포를 이용한 실험에서 보고되었다[10]. 이와 유사한 연구결과들이 간세포[5]와 사람의 glioma세포[8]에서도 보고되었다. 또한 H_2O_2에 의한 세포독성이 신선하게 분리한 신장세포가 배양된 신장세포와는 다른 민감성을 보이고 있음이 보고되었으나[7], 지질의 과산화가 신선하게 분리한 신장세포와 배양된 신장세포사이에 다른 지에 대해서는 분명하지 않다.

따라서 본 연구에서는 토끼의 신선하게 분리한 신장세포와 배양된 신장세포에서 반응성산소기에 의한 세포손상시 지질의 과산화가 어떤 역할을 하는지에 대하여 조사하고자 하였다.

*논 문 접 수: 2002년 11월 30일
수정재접수: 2002년 12월 20일
†별책 요청 저자: 정순희, Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea
Tel: 055-740-1847, Fax: 055-740-1846 e-mail: jsh53@chc.ac.kr
이 논문은 2002년 진주보건대학 학술연구 논문 연구비 지원비로 수행되었음.

재료 및 방법

토끼의 신장에서 신선하게 분리한 신장세포를 신피질 절편을 이용하였고, 배양된 신장세포는 근위세뇨관 유래세포인 opossum kidney (OK) 세포를 이용하였다. 반응성산소기들의 대처 약물로는 H_2O_2를 사용하였다.

1. 신피질 절편의 제작

신피질 절편의 제작은 토끼를 희생시킨 후 신장을 들어내어 차가운 생리식염수로 신동맥내에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3~0.5 mm 두께의 신피질 절편을 만들어 사용하였다.

2. Opossum kidney (OK) 세포의 배양

신장세뇨관에서 유래한 배양세포인 OK세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma Chemical)에 10% 송아지 혈청 (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY)을 첨가한 배양액에서 5% CO_2~95% 공기, 포화습도, 온도 37℃ 조건 하에서 배양하였다. 처음에는 250 ml 플라스크에서 배양하며 3일에 한번씩 새 배양액으로 교환해 주었고, 6일 후 0.1% trypsin/EDTA를 이용하여 subculture를 시행하며 이후 2일에 한번씩 새 배양액으로 갈아주며 5~7일째 실험에 사용하였다.

3. 세포손상 측정

신피질 절편에서 세포손상 정도를 확인하기 위해서는 lactate dehydrogenase (LDH) 유리를 측정하여 판정하였는데, 적당한 조건에서 배양한 세포들을 용액으로부터 분리한 후 세포를 마쇄시켜 배양용액과 마쇄된 조직액 각각 50 μl를 취하여 LDH 활성을 LDH assay kit (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였다.

배양세포에서 세포손상은 trypan blue exclusion assay로 측정하였는데, 세포들을 H_2O_2에 노출시킨 다음 0.025% trypsin을 처리하여 세포를 수거하였다. 세포를 4% trypan blue용액으로 배양한 다음 광학현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포질 속에 색소가 들어 있는 세포와 들어 있지 않는 세포를 헤아렸으며, 세포질 속에 색소가 들어 있는 세포를 비생존세포로 계산하였다. 성적은 전체 세포 중 비생존세포의 비로 나타내었다.

4. Lipid peroxidation 측정

세포막 지질의 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 Uchiyama와 Mihara의 방법[17]으로 측정하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 신피질 절편 및 세포를 차가운 1.15% KCl용액 (5% wt/vol) 속에서 파쇄하였다. 이 조직파쇄균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid용액 1 ml을 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 2000 g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536과 520 nm에서 측정하였다. MDA값은 단백질 1 mg 당 nmoles로 표시하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법[3]으로 측정하였다.

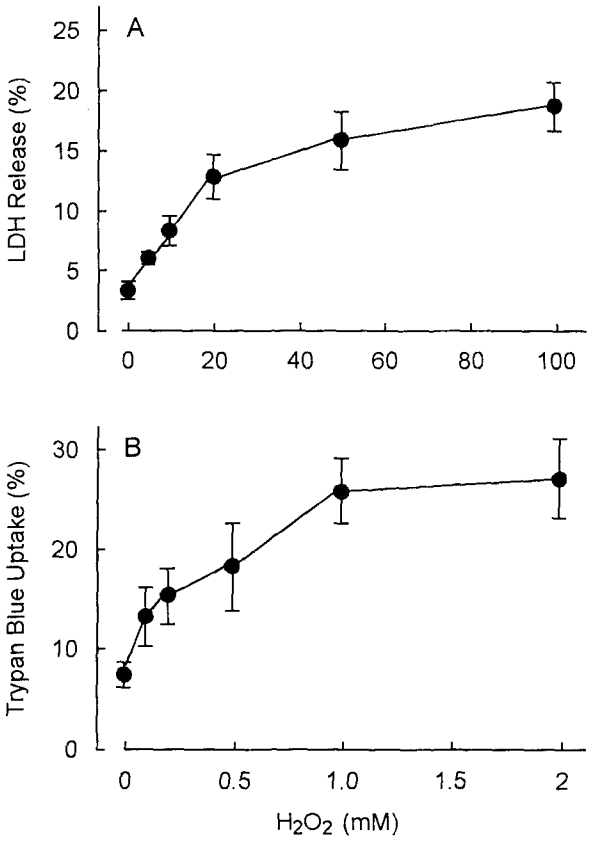

Fig. 1. Dose-dependency of H_2O_2 cytotoxicity in rabbit renal cortical slices **(A)** and opossum kidney cells **(B)**. Renal cortical slices and OK cells were treated with various concentrations of H_2O_2 for 120 min at 37℃. Data are mean±SE of three experiments.

5. 자료정리 및 통계처리

성적은 평균치±표준오차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였고 *P* 값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포손상에 대한 H_2O_2의 농도 변화의 영향

Fig. 1은 신피질 절편 (A) 및 OK세포 (B)에서 세포손상에

대한 H_2O_2의 농도변화의 영향을 조사한 것이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 신피질 절편에서 비가역적인 세포손상을 나타내는 LDH유출은 H_2O_2의 농도가 5에서 100 mM까지 증가함에 따라 증가하였는데, 5 mM H_2O_2에서 LDH유출이 정상조직의 3.17±0.83%에서 5.95±0.54%로 증가하였으며, 100 mM에서는 18.65±2.08%로 증가하였다.

OK세포를 이용한 실험에서도 세포사망을 나타내는 trypan blue를 uptake하는 세포의 수가 H_2O_2의 농도가 증가함에 따라 증가하였으나, H_2O_2의 농도가 신피질 절편에서 보다 훨씬 낮은 농도에서 나타났다. H_2O_2의 농도를 0.1에서 2 M까지 변화시켜 관찰한 결과 신피질 절편에서 5에서 100 mM까지 변화시켜 관찰한 결과와 유사하였다. 따라서 배양된 세포가 신피질 절편에 비하여 H_2O_2에 민감하게 영향을 받고 있음을 알 수가 있다. 이후 실험에서는 H_2O_2농도를 신피질 절편에서는 100 mM를 사용하였고, OK세포에서는 1 mM을 사용하였다.

2. H_2O_2의 독성효과에 대한 환원성 glutathione (GSH) 및 dithiothreitol (DTT)의 영향

GSH는 여러 독성물질에 의한 세포손상을 방지하는 해독효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포내에서 항산화제 역할을 하고 있기 때문에[5,9,16], 외부에서 첨가한 GSH는 반응성산소기에 의한 세포손상을 방지할 수 있을 것이다. 따라서 본 실험에서 H_2O_2에 의한 세포손상을 방지하는 효과가 신피질 절편과 OK세포에서 차이가 있는지를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 H_2O_2를 처리할 시에 2 mM GSH를 같이 첨가한 결과 신피질 절편에서나 OK세포에서 H_2O_2에 의한 세포손상이 거의 완전히 방지되었다.

반응성산소기들은 세포막에 있는 sulfhydryl group을 산화시켜 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 H_2O_2에 의한 세포손상에 sulfhydryl group을 환원시키는 제제인 DTT의 영향을 조사하였다. 2 mM DTT 또한 신피질 절편에서나 OK세포에서 H_2O_2에 의한 세포손상을 완전히 방지하였다.

3. H_2O_2의 독성효과에 대한 철착염제의 영향

H_2O_2에 의한 세포손상시 철의 역할을 조사하기 위하여 철착염제인 deferoxamine과 phenanthroline을 처리하여 관찰하였다. Fig. 3에 보는 바와 같이 이들 두 약물들은 신피질 절편에서나 OK세포에서 H_2O_2에 의한 세포손상을 완전히 방지하였다. 이러한 결과는 신장세포에서는 H_2O_2가 세포독성을 나

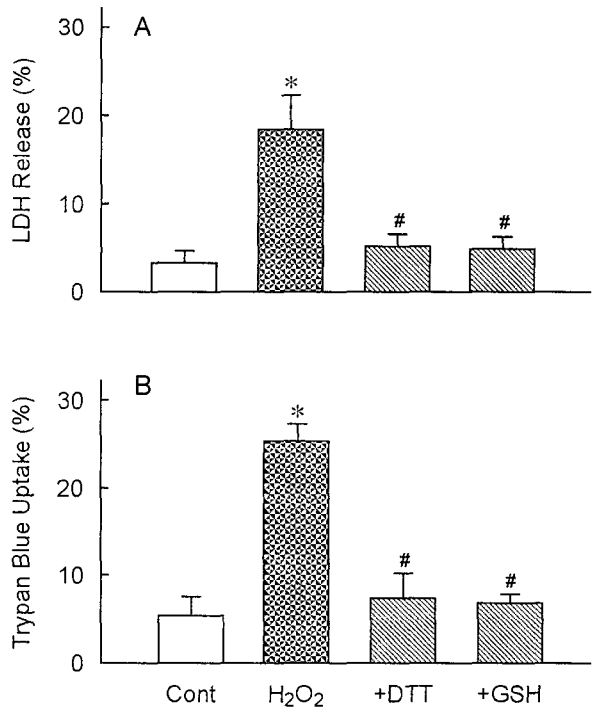

Fig. 2. Effect of thiols on H_2O_2-induced cell injury in rabbit renal cortical slices **(A)** and opossum kidney cells **(B)**. Renal cortical slices and OK cells were treated with 50 mM and 0.5 mM H_2O_2, respectively, for 120 min at 37℃ in the presence or absence of 2 mM glutathione (GSH) and 2 mM dithiothreitol (DTT). Data are mean±SE of four experiments. *P<0.05 compared with the control; #P<0.05 compared with H_2O_2 alone.

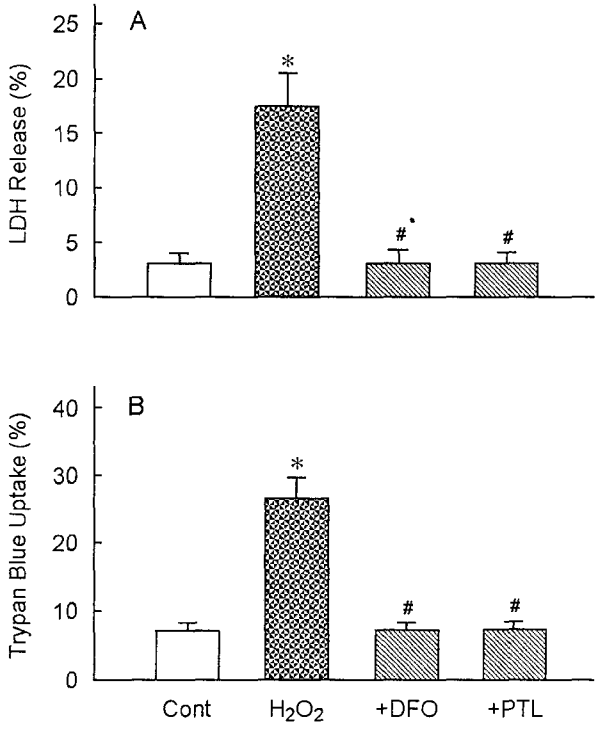

Fig. 3. Effect of iron chelators on H_2O_2-induced cell injury in rabbit renal cortical slices **(A)** and opossum kidney cells **(B)**. Renal cortical slices and OK cells were treated with 50 mM and 0.5 mM H_2O_2, respectively, for 120 min at 37℃ in the presence or absence of 2 mM deferoxamine (DFO) and 0.2 mM phenanthroline (PTL). Data are mean±SE of four experiments. *P<0.05 compared with the control; #P<0.05 compared with H_2O_2 alone.

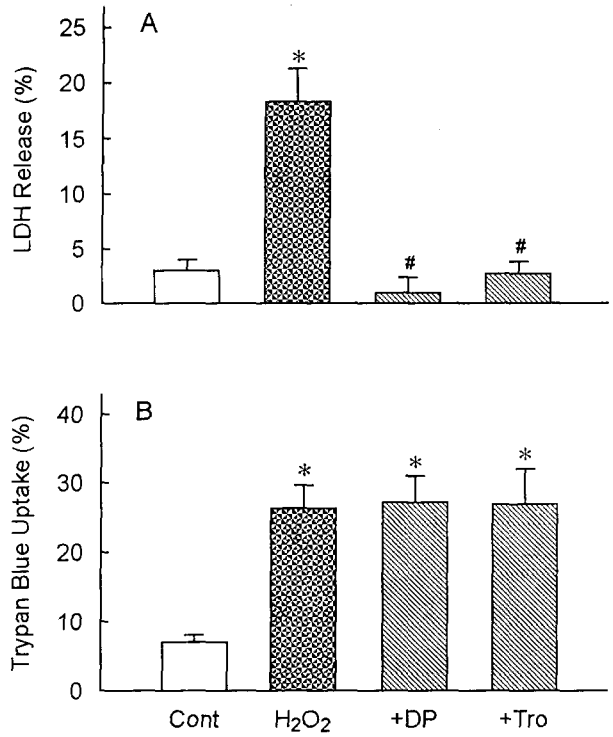

Fig. 4. Effect of antioxidants on H_2O_2-induced cell injury in rabbit renal cortical slices **(A)** and opossum kidney cells **(B)**. Renal cortical slices and OK cells were treated with 50 mM and 0.5 mM H_2O_2, respectively, for 120 min at 37℃ in the presence or absence of 0.01 mM N,N-diphenyl-p-phenylenediamine (DP) and 1 mM Trolox (Tro). Data are mean±SE of four experiments. *P<0.05 compared with the control; #P<0.05 compared with H_2O_2 alone.

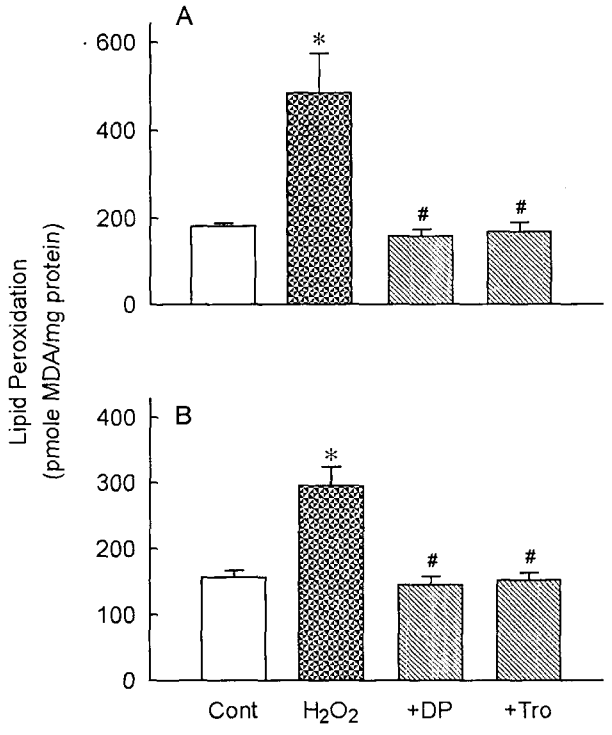

Fig. 5. Effect of antioxidants on H_2O_2-induced lipid peroxidation in rabbit renal cortical slices **(A)** and opossum kidney cells **(B)**. Renal cortical slices and OK cells were treated with 50 mM and 0.5 mM H_2O_2, respectively, for 120 min at 37℃ in the presence or absence of 0.01 mM N,N-diphenyl-p-phenylenediamine (DP) and 1 mM Trolox (Tro). Data are mean±SE of four experiments. *P<0.05 compared with the control; #P<0.05 compared with H_2O_2 alone.

타낼 때 철이 중요한 역할을 하고 있음을 가르킨다.

4. H_2O_2의 독성효과에 대한 항산화제의 영향

일반적으로 신장세포를 포함한 여러 세포에서 반응성산소기와 같은 oxidant들은 지질의 과산화를 초래하여 세포의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다[5,15]. 따라서 신피질 절편에서나 OK세포에서 H_2O_2에 의한 세포손상이 항산화제에 의해 영향을 받는 지를 조사하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 신피질 절편에서 H_2O_2에 의한 세포손상은 지질에 용해되는 항산화제인 DPPD (0.01 mM)와 물에 용해되는 항산화제인 Trolox (1 mM)에 의해 완전히 방지되었다. 그러나 OK세포에서는 H_2O_2에 의한 세포손상이 이들 항산화제에 의해 방지되지 않았다 (Fig. 4B).

5. H_2O_2의 의한 지질의 과산화에 대한 항산화제의 영향

위의 Fig. 4에서 보인 실험결과에서 OK세포에서 항산화제들이 H_2O_2에 의한 세포손상을 방지하지 못한 것이 본 실험에 사용한 H_2O_2의 농도가 지질의 과산화를 증가시키지 못하였거나 사용한 항산화제들이 지질의 과산화를 억제하지 못하는 결과일 수 있다. 이를 확인하기 위하여 신피질 절편과 OK세포에서 H_2O_2가 지질의 과산화를 증가시키는 지와 항산화들이 지질의 과산화를 억제할 수 있는 지를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 신피질 절편에서나 OK세포에서 본 실험에 사용한 H_2O_2농도가 지질의 과산화를 유의하게 증가시켰으며 이러한 변화는 항산화제에 의해 완전히 억제되었다.

고 찰

반응성산소기가 여러 형태의 급성신부전에 관련되어 있는 것으로 알려졌으나 본 연구자들의 이전 연구에서[12,13,18,19], 반응성산소기들이 어떤 기전으로 신장세포의 손상을 유발하는지에 대해서는 분명하게 밝혀지지 않았다. 반응성산소기들은 지질을 공격하여 불포화 지방산을 많이 함유하고 있는 세포막의 지질의 과산화시키는 효과를 가지고 있으나, 지질의 과산화는 세포가 손상이 일어난 후 2차적으로 증가하기도 하기 때문에[5] 반응성산소기에 의한 지질의 과산화가 세포손상의 원인일 수도 있지만 세포손상으로 인한 2차적인 결과일 가능성도 있다.

본 실험에서 신장피질 절편과 OK세포를 H_2O_2에 노출시켰을 때 각각의 세포손상의 지표인 LDH유출과 trypan blue uptake가 H_2O_2의 농도에 비례하여 증가하였다 (Fig. 1). 그러나 신피질 절편에서는 LDH유출이 5~100 mM 농도범위내에서 나타났으나, OK세포에서는 이 보다 약 50배 낮은 0.1~2 mM 농도에서 유사한 정도로 세포손상이 나타났다. 이러한 결과는 Kim 등[7]이 보고한 것과 유사하다. 이들의 연구결과에 의하면 신선하게 분리한 신장세포가 배양된 세포보다 H_2O_2에 저항성을 가지고 있는데, 이러한 원인은 세포를 배양함으로서 세포내 H_2O_2를 분해시키는 효소인 catalase의 발현 및 활성이 감소되어 있기 때문인 것으로 확인하였다.

H_2O_2는 glutathione peroxidase에 의해 분해되어 물로 전환되며, 이때 GSH가 GSSG로 산화된다. 정상적인 세포기능을 유지하는 데에는 세포내 GSH가 일정 농도 유지되어야만 한다. 만약 세포내 GSH의 농도가 감소하게 되면 반응성산소기에 의한 세포손상을 더욱 촉진시키는 것으로 알려져 있기 때문에[1,11], GSH는 반응성산소기들에 의한 세포손상을 방지하고 있다. 본 실험에서도 GSH를 H_2O_2와 동시에 첨가하였을 때 H_2O_2에 의한 세포손상이 방지되었고, 이러한 효과는 신피질 절편이나 OK세포에서 유사하였다 (Fig. 2). 또한 thiol reagent인 DTT에 의해서도 같은 효과가 나타남으로서 H_2O_2에 의한 세포손상에 GSH와 sulfhydryl group이 중요한 역할을 하고 있음은 신피질 절편과 OK세포가 유사함을 알 수가 있다.

H_2O_2는 2가 철과 반응하여 보다 독성이 강한 hydroxyl radical로 전환된다[5]. 따라서 H_2O_2가 H_2O_2 자체보다 hydroxyl radical로 전환되어 세포독성을 나타낸다면 철을 제거하여 hydroxyl radical로의 전환을 막게 되면 H_2O_2에 의한 세포손상이 방지될 것이다. 신피질 절편과 OK세포에서 모두 이러한 효과가 나타나는지를 확인하기 위하여 철착염제인 deferoxamine과 phenanthroline을 처리한 결과 H_2O_2에 의한 세포손상이 완전히 방지되었으며, (Fig. 3) 이러한 효과는 두 세포들간에 차이가 없었다. 이러한 결과는 신피질 절편이나 OK세포에서 H_2O_2는 hydroxyl radical로 전환되어 독성을 나타내는 것으로 사료된다.

본 실험의 가장 의미있는 결과는 항산화제에 의한 효과가 신피질 절편과 OK세포에서 다르게 나타난다는 것이다. H_2O_2와 같은 반응성산소기들은 지질의 과산화를 유도하여 세포손상을 일으킬 가능성이 많다. 만약 H_2O_2가 지질의 과산화를 통해 세포손상을 일으킨다면 그 세포손상은 항산화제에 의하여 방지될 것이다. 본 실험결과 신피질 절편에서는 기대한 데로 H_2O_2에 의한 세포손상이 항산화제인 DPPD와 Trolox에 의해 완전히 방지되었으나, OK세포에서는 세포손상이 이들 항산화들에 의해 아무런 영향을 받지 않았다 (Fig. 4). OK세포를 이용한 실험에서 나타난 이러한 실험결과가 H_2O_2가 OK세포에서는 지질의 과산화를 증가시키지 못하기 때문일 수 있다. 그러나 지질의 과산화를 측정한 실험결과는 OK세포나 신피질 절편에서와 마찬가지로 H_2O_2가 지질의 과산화를 증가시켰다. 이러한 결과로 신피질 절편에서는 지질의 과산화가 세포손상의 직접적인 원인이지만, OK세포에서는 지질의 과산화가 세포손상의 직접적인 원인이 아니라 세포손상의 결과로 인해 나타난 것으로 생각된다. 지질의 과산화가 세포손상의 결과로 인해 증가될 수 있음은 다른 연구에서도 보고된 바 있다[5]. 이러한 두 세포군에서 나타난 세포손상의 차이에 대해서는 향후 이에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1) Arrick BA, Nathan CF, Griffith OW and Cohn ZA (1982): Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis. *J Biol Chem*, **257:** 1231-1237.

2) Arstila AU, Smith MA and Trump BF (1972): Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization. *Science*, **175:** 530-533.

3) Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72:** 248-524.

4) Chance B, Sies H and Boveris A (1979): Hydroperoxide metabolism un mammalian organs. *Physiol Rev*, **59:** 527-605.

5) Farber JL, Kyle ME and Coleman JB (1990): Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*, **62:** 670-679.

6) Kim YK and Kim YH (1996): Differential effect of Ca^{2+} on oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane functional integrity in renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol*, **141:** 607-616.

7) Kim YK, Ko SH, Woo JS, Lee SH and Jung JS (1998): Difference in H_2O_2 toxicity between intact renal tubules and cultured proximal tubular cells. *Biochem Toxicol*, **56:** 489-495.

8) Lee YW, Ha MS and Kim YK (2001): H_2O_2-induced cell death in human glioma cells: role of lipid peropxidation and PARP activation. *Neurochem Res*, **26:** 337-343.

9) Meister A and Anderson ME (1983): Glutathione. *Annu Rev Biochem*, **52:** 711-760.

10) Min SK, Kim SY, Kim CH, Woo JS, Jung JS and Kim YK (2000): Role of lipid peroxidation and poly (ADP-ribose) polymerase activation in oxidant-induced membrane transport dysfunction in opposum kidney (OK) cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **166:** 196-202.

11) Orrenius S, Ormstad K, Thor H and Jewell SA (1983): Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Federation Proc*, **42:** 3177-3188.

12) Paller MS and Neumann TV (1991): Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, **40:** 1041-1049.

13) Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG and Ward PA (1984): Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, **51:** 396-403.

14) Ross D and Moldeus P (1993): Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation, ed. by Vigo-Pelfrey C, Vol II, 151-170, CRC Press, Boston.

15) Salahudeen AK (1995): Role of lipid peroxidation in H_2O_2-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Am J Physiol*, **268:** 30-38.

16) Starke PE and Farber JL (1985): Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*, **260:** 86-92.

17) Uchiyama M and Mihara M (1978): Determination of malonaldehyde precusor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, **86:** 271-278.

18) Walker PD and Shah SV (1988): Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats *J Clin Invest*, **81:** 334-341.

19) Weinberg JM (1991): The cell biology of ischemic renal injury. *Kid Int*, **39:** 476-500.