

Effects of Zinc and Its Chelators on ERG b-Wave Sensitivity During the Light Adaptation in Bullfrog Retina

Kyung-Hee Hwang, Young-Hwal Kim, and Jong-Seok Park

Department of Clinical Laboratory Science, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Zinc plays a key role in genetic expression, cell division, and cell growth and is essential for the functions of more than 450 metalloenzyme. There are high concentrations of zinc in pigment epithelium in bullfrog eye. Zinc deficiency causes night blindness and abnormal dark adaptation. The purpose of this study was to identify ERG (electroretinogram) b-wave sensitivity during light and dark adaptation in bullfrog retina after zinc and zinc chelators treatment such as histidine and TSQ (N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfon amide). Especially, we focused whether histidine act as a zinc chelator in the Muller cell. The results of our study are summarized as follows: 1) Both zinc and histidine elevated ERG b-wave amplitude and threshold in Muller cells by accelerating rhodopsin regeneration time and increased a-peak absorbance during light adaptation. 2) TSQ reduced those by prolonging rhodopsin regeneration time and decrement of a-peak absorbance during light adaptation. 3) Zinc shortened rhodopsin regeneration time and prolonged a-peak absorbance. These results suggested that histidine may act as a zinc-mediated transporter in presynaptic Muller cell membrane rather than zinc chelator and acts as a GABA-receptor inhibitor which blocks Cl^- influx to the postsynapse.

Key Words : ERG b-wave, Retina, Zinc, Histidine, TSQ, Zinc chelator

서론

망막전위도(ERG, electroretinogram)란, 빛에 대한 안구의 반응으로 생긴 전기적인 신호를 나타내는 안전도로 임상에서 망막 손상이나 질병의 유무를 확인하는 지표로 이용된다. ERG는 일반적으로 a, b, c, d-wave로 구성되어 있으며, a-wave는 광수용체에 의해서 나타나고, b-wave는 망막이 광자극에 의해 내핵층(inner nuclear layer)에 있는 필러 세포가 탈분극(depolarization)되어 생기게 되며, 또한 c-wave는 망막 색소 상피층에 의해, 그리고 d-wave는 빛에 의한 자극이 중단되어 재분극(repolarization)될 때 생성

되어 진다(Fig. 1).

생명체의 정상적 대사 작용을 위한 기본적인 미량원소 중 아연은 인체에서 두 번째로 풍부한 원소이다(Roth와 Kirchgessner, 1980). 450 여 종류 이상의 metalloenzyme들의 필수적 구성 요소로, 효소의 구조나 촉매 활성화를 위해 요구되어지며 조절작용에 관여하는 것으로 알려지고 있다(Terhune와 Sandstead, 1972; Bhagavan, 1991). 또한 DNA transcription factor로서 유전적 표현, 세포 분열, 세포 성장에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 이러한 아연은 뇌, 혈액, 뼈, 안구, 전립선, 피부 등 인체 조직에 널리 분포되어 있는데, 이러한 아연이 결핍되면 여러 가지 증후군이 발생한다(Bertini 등, 1986; Prasad 등, 1993). 특히 안구의 망막에서 맥락막까지 집중적으로 분포되어 있어서 야맹증(night blindness), 비정상적 암순응(abnormal dark adaptation) 등이 발생되고, 이들 증후군은 zinc-binding enzyme인 retinol dehydrogenase (RD)의 작용과 직접적인 연관성이 있다(Christian와 West, 1998; Kim 등, 2000; Kim와 Kim, 2000; Ugarte와 Osborne, 1999).

Corresponding Author : Hwang, Kyung-Hee. Department of Clinical Laboratory Science, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea.
Tel : 053-320-1356, E-mail : chesca@dhc.ac.kr

Received : 8 March 2011
Return for modification : 14 March 2011
Accepted : 29 June 2011

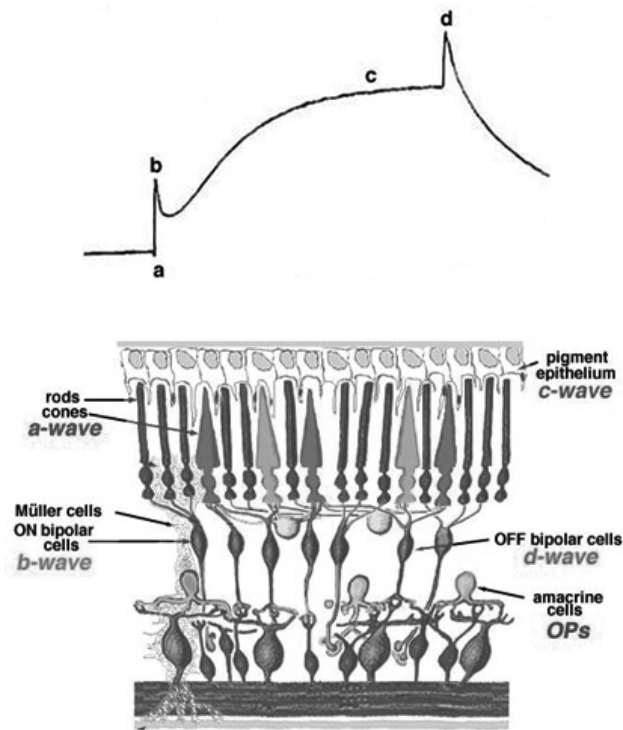


Fig 1. Representation of various components of ERG wave. A schematic view of the retina, to show where the major components of ERG originates.

따라서 로돕신이 재합성되기 위해서는 retinol이 RD에 의해 retinal로 재산화되어야만 하는데, 아연이 결핍되게 되면 RD의 활성이 감소되어 로돕신의 합성이 원활하지 못하게 됨으로써 결국 야맹증과 비정상적 암순응을 유발하게 된다. 또한 비타민 A의 운반을 조절하는 retinol binding protein (RBP)의 합성도 저해되어 비타민 A의 흡수, 수송, 활용 등에 영향을 미침으로써 visual cycle에까지 이상이 생기게 되는데 (Grahn 등, 2001), 시각적 감수성이 순수한 아연에 의한 것인지를 보기 위하여 아연의 킬레이트를 처리하였다. 일반적으로 아연의 킬레이트에는 여러 가지가 있으며, 대부분 membrane impermeable chelator로서 작용한다. 그 종류로는 CaEDTA (Ca⁺⁺-ethylenediaminetetraacetic acid), dithi-zone (diphenylthiocarbazon), NEM (N-ethylmalamide), EDDBA (2,2'-ethylenediamino-dibutyric acid), TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl ethylenediamine), zinquin ((2-methyl-8-p-toluene sulphon amide-6-

quinolyloxy) acetic acid), TSQ (N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfon amide), ethambutol, histidine 등이 있다 (Sawada 등, 1993). 본 실험에서는 membrane impermeable chelator로서 작용하는 TSQ와 histidine을 사용하였다. 따라서 명순응 동안 아연과 histidine을 처리하여 ERG b-wave의 감수성과 로돕신의 regeneration에 어떠한 효과가 있는지 알아 볼 것이며, 또한 TSQ 처리 후 ERG b-wave의 감수성과 로돕신의 regeneration을 측정하여 아연의 킬레이트로써 작용하는지를 확인해 볼 것이다. 특히 본 실험에서는 밀러 세포에서 histidine이 아연의 킬레이트로써 작용하는지에 관하여 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용한 동물은 황소개구리(일명 bullfrog)이다. 실험에 앞서, 암순응(dark adaptation)을 시키기 위해 황소개구리를 암상자 내에 30분 이상 두었으며, 그 후 모든 실험은 경북대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 수행하였다. *In vivo*에서 혈관을 통한 지속적인 산소 공급이 이루어지지 않을 경우, 눈에서는 무산소증으로 인해 ERG의 b-wave가 소실되게 되므로 지속적으로 산소를 공급시켜 30분 이상 지난 후 안정화한 다음 ERG를 관찰하였다. 실험에 사용한 normal ringer solution (NRS)의 조성은 각각 105 mM NaCl (Orienta Chemical), 2.5 mM KCl (Orienta Chemical), 2 mM MgCl₂ (Yakuri Pure Chemical), 1 mM CaCl₂ (Orienta Chemical), 5 mM Glucose (Sigma), 5 mM NaHCO₃ (Sigma), 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)로 이루어져 있으며, 용액내의 아연 및 다른 금속이온의 함량을 최소화하기 위해 용매로서 deionized DDW (double distilled water)를 사용하여 적정 농도로 만든 후 pH를 7.4-7.6으로 맞추었다. NRS를 control로 하여 ZnCl₂ (Sigma)와 아연의 킬레이트인 TSQ를 사용하였으며, 또한 histidine (C₆H₉N₃O₂, Sigma)을 사용하여 실험을 하였다.

2. 광학시스템

일정한 빛을 안구에 조사하기 위해 사용된 optical system은 크게 Faraday cage와 recording system으로 구성되는데, Faraday cage 내에 있는 자극광(stimulus light ; SL)과 배경광(background light ; BL)은 각각 halogen lamp의 광원으로부터 시작되는 빛의 광자극 시간을 조절하기 위한 shutter (Uniblitz, model VS25SITO), 광량을 조절하기 위한 neutral density filter (Melles Griot, 0.3 FIV 001, 013, 021, 035, 047 ; ND filter), 일정한 파장의 광선만을 통과시키기 위한 간섭필터(Edmund Scientific)를 지난 뒤, mirror와 beam splitter를 통과한 후 eye-cup 시료가 장착되어 있는 sample holder에 도달하게 되면 ERG가 생성된다. 생성된 ERG는 amplifier나 AD/DA converter를 통해서 컴퓨터에 저장된다. 이때 간섭필터는 막대 세포가 가장 민감하게 반응하는 505 nm로 고정하였고 광노출 시간은 200 ms로 하였다.

3. Agar bridge Ag-AgCl electrode 제작

광자극으로 발생하는 전기적인 차이를 감지하기 위해 agar bridge Ag-AgCl electrode를 사용하였다. Agar bridge Ag-AgCl electrode를 만들기 위해, 고순도의 은선을 적당한 길이로 자른 다음 사포로 문질러서 표면을 고르게 하고 0.1 M HCl로 약 3시간 정도 전기분해하여 Ag-AgCl electrode를 만든 후, 3 M KCl 용액으로 3% agar를 만들어 100℃로 가열하여 녹여서 micro pipette에 채움으로써 agar bridge Ag-AgCl electrode를 만들었다. 완성된 electrode를 sample holder에 접속시키고 Modified Ussing Chamber에 장착시킨 후 ERG 기록을 위해 amplifier에 연결하였다.

4. 로돕신 흡수 스펙트럼의 측정

암순응된 eye-cup을 NRS와 NRS에 적정 농도의 아연, histidine, TSQ를 처리한 각 용액에 1시간 동안 25℃에서 배양시킨 후, eye-cup으로부터 색소 상피층을 분리하여 망막만을 얻었다. 망막을 지지대에 얹은 후 spectrophotometer cuvette에 장착하고, 400~700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 암순응과 명순응에서의 아연, histidine, TSQ의 흡광도 차이를 비교하기 위하여 배경광을 ND 0의 세기로 10분간 시료에 광노출시켜 명순응을 만든 후 흡광도(OptizenView

3320UV, MECASYS, Korea)를 측정하였다.

5. 데이터 분석

아연처리 및 TSQ, histidine 처리에 따른 망막전위도 측정 실험 데이터들은 Axotape ver 9.0 프로그램으로 분석하였고, 흡수 스펙트럼 분석 실험 데이터들은 UVPC ver 3.91 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 적정 아연 농도 측정

망막에 대한 아연의 효과를 알아보기 위해, 먼저 적정 아연 농도를 측정하였다. 암순응된 안구를 사용해서 NRS를 control로 하여, ZnCl₂의 농도를 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM 범위가 되도록 점진적으로 증가시키면서 일정한 자극광(ND 2)을 주어 상대적인 b-wave amplitude의 변화를 관찰하였다. ZnCl₂의 농도가 증가함에 따라 b-wave가 점진적으로 증가하여 100 μM에서는 control에 비해 2~3배까지 증가를 나타내었다. 그러나 ZnCl₂의 농도가 1000 μM로 증가하면 아연의 세포 독성에 의해 b-wave가 오히려 감소함을 볼 수 있었다. 본 실험에서는 100 μM을 아연의 적정 농도로 결정하고, 이후의 암순응과 명순응의 실험에 100 μM의 ZnCl₂를 처리하기로 하였다(Fig. 2).

2. 아연 처리 전·후 ERG 변화

자극광 증가에 따른 절대적인 b-wave amplitude의 변화를 관찰하였다. 또한 암순응에서의 ZnCl₂ 처리 전·후와 일정한 배경광(ND 2) 하에서 명순응 시킨 후, ZnCl₂ 처리 전·후를 비교하였다. 그 결과 자극광(ND 7~ND 0)이 증가됨에 따라 b-wave가 모두 증가하였으며, 암순응과 명순응에서 모두 ZnCl₂를 처리함으로써 b-wave가 월등히 증가하였다. 여기에서 ND 7에서 ND 6의 의미는 1 log unit로써 빛의 밝기가 10배씩 증가함을 의미한다(Fig. 3).

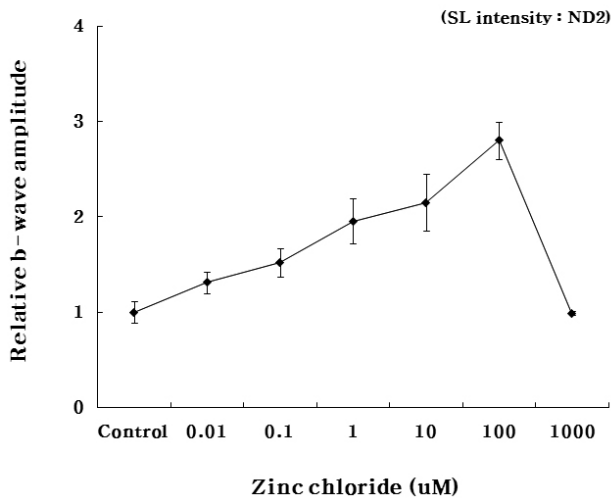


Fig. 2. Optimal concentration curves of zinc. The ordinate represents the relative peak amplitude of the b-wave, which standardizes that the value of control used normal Ringer's solution. Each response was obtained under ND 2 stimulus light intensity. The optimal zinc concentration for the highest response is 100 μ M, not showing the cell toxicity in any case.

3. 적정 histidine 농도 측정

망막에 대한 histidine의 효과를 알아보기 위해, 적정 아연 농도 측정과 동일한 방법으로 histidine의 적정 농도를 측정하였다. 농도를 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M 범위가 되도록 점진적으로 증가시키면서 상대적인 b-wave amplitude의 변화를 관찰한 결과, 농도가 증가함에 따라 b-wave가 계속 증가하였으며, 1000 μ M에서는 많은 실험에서 포화되는 경향을 보였다. 그 증가율이 ZnCl₂ 보다는 작았지만 가장 두드러진 증가를 보인 100 μ M을 histidine의 적정 농도로 결정하고, 이후의 암순응, 명순응의 실험에 100 μ M의 histidine을 처리하기로 하였다(Fig. 4).

4. Histidine 처리 전 · 후 ERG 변화

자극광 증가에 따른 절대적인 b-wave amplitude의 변화를 관찰하였다. 또한 암순응에서의 histidine 처리 전 · 후와 일정한 배경광(ND 2) 하에서 명순응 시킨 후, histidine 처리 전 · 후를 비교하였다. 그 결과 자극광(ND 7~ND 0)이 증가됨에 따라 b-wave가 모두 증가하였으며, 암순응과 명순응 모두 histidine을 처리함으로써 b-wave가 월등히 증가하였

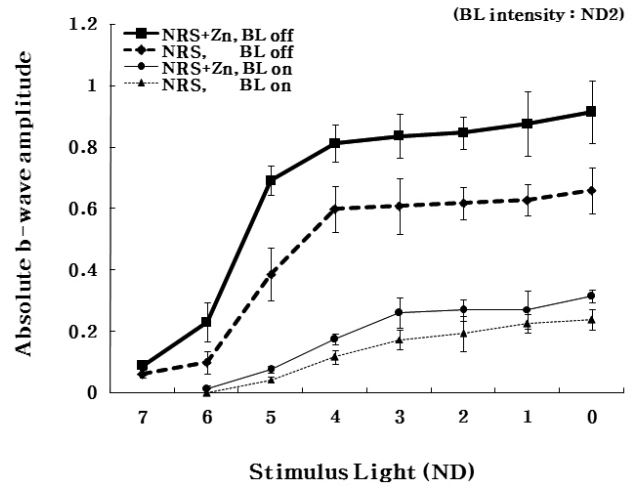


Fig. 3. The Change of absolute b-wave amplitude during different stimulus light in the presence and absence of background light ND 2 in NRS or NRS plus optimal ZnCl₂ concentration. After ZnCl₂ treatment, b-wave increased according to the increase of stimulus light (ND 7~ND 0) in both cases of dark adaptation and light adaptation.

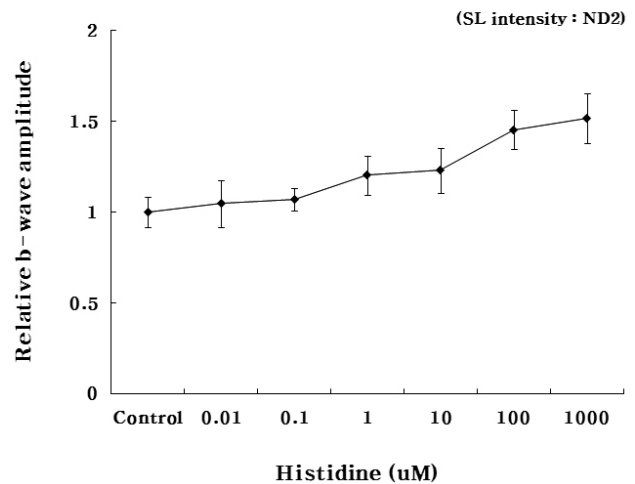


Fig. 4. The change of relative b-wave amplitude according to the addition of different concentrations of histidine in the presence of the stimulus light ND 2. There was a saturating tendency at 1000 μ M in many experiments; therefore the optimum concentration of histidine is 100 μ M, at which the most remarkable increase was shown.

다(Fig. 5).

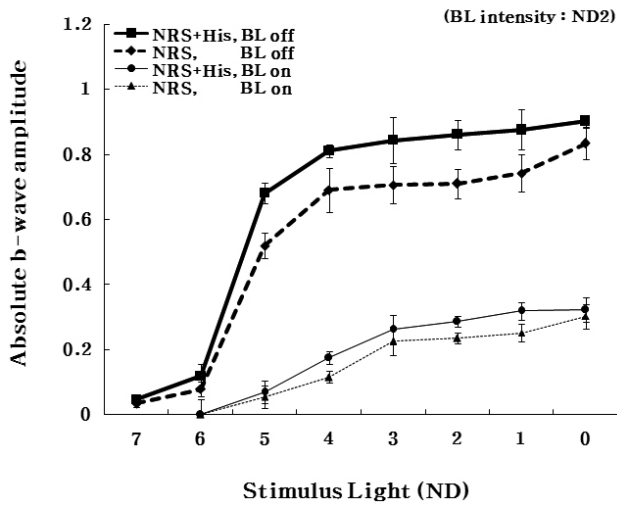


Fig. 5. The change of absolute b-wave amplitude according to the increase of stimulus light, before or after treatment with histidine, during dark adaption and light adaptation. In both cases of dark adaptation and light adaptation, histidine treatment resulted in the increase of b-wave according to the increase of stimulus lights (ND 7~ND 0)

5. 아연과 histidine 처리에 따른 ERG 변화

일반적으로 반응을 일으킬 수 있는 최소한의 자극의 세기를 역치(threshold)라고 하는데, 본 실험에서는 광자극에 의해 반응하는 ERG의 최소 amplitude (0.5 mV)를 역치로 정하였다. 우선 아연에 대한 histidine의 작용을 알아보기 위하여 NRS에 ZnCl₂를 첨가 후 histidine을 처리하여 자극광(ND 2)을 주어 상대적인 b-wave amplitude와 역치의 변화를 관

찰하였다(Fig. 6A). 다음은 NRS에 histidine을 첨가 후 ZnCl₂를 처리하여 자극광(ND 2)을 주어 상대적인 b-wave amplitude와 threshold의 변화를 관찰하였다(Fig. 6B). NRS에 아연 또는 histidine을 처리했을 때 모두 b-wave와 threshold가 증가하였다. 특히 ZnCl₂와 histidine을 함께 처리했을 때도 마찬가지로 처리 순서에 상관없이 b-wave와 threshold가 증가하였으며, 그 증가폭이 아연 또는 histidine만 처리했을 때 보다 훨씬 컸다. Histidine이 아연의 킬레이트로 작용한다면 아연 첨가 후 histidine을 처리했을 때 b-wave가 감소되어야 하는데, 오히려 증가하였으므로 histidine이 아연의 킬레이트로 작용하지 않았음을 알 수 있었다.

6. 아연과 histidine, TSQ 처리에 따른 ERG 변화

아연의 킬레이트로 작용하는 10⁻³ M TSQ를 500 μL(유효 농도 : 2.5 × 10⁻⁵ M) 처리하였다(Park 등, 2007). 이때 유효 농도란 NRS에 TSQ를 처리하여 자극광(ND 2)을 주어 b-wave가 1/2로 감소할 때의 농도를 의미한다. NRS에 아연의 킬레이트인 TSQ를 처리 후 자극광 증가에 따른 절대적인 b-wave amplitude를 측정하였다. TSQ 처리 후 b-wave가 감소함으로써 TSQ가 아연의 킬레이트로 작용하였음을 알 수 있다(Fig. 7). NRS에 ZnCl₂와 histidine, TSQ를 처리한 후 자극광(ND 2)을 주어 상대적인 b-wave amplitude와 threshold를 측정하였다. NRS에 ZnCl₂와 histidine을 처리하였을 때 b-wave와 threshold가 증가하였으며, TSQ를 처리한 후에는 b-wave와 threshold가 감소하였다. 이는 TSQ

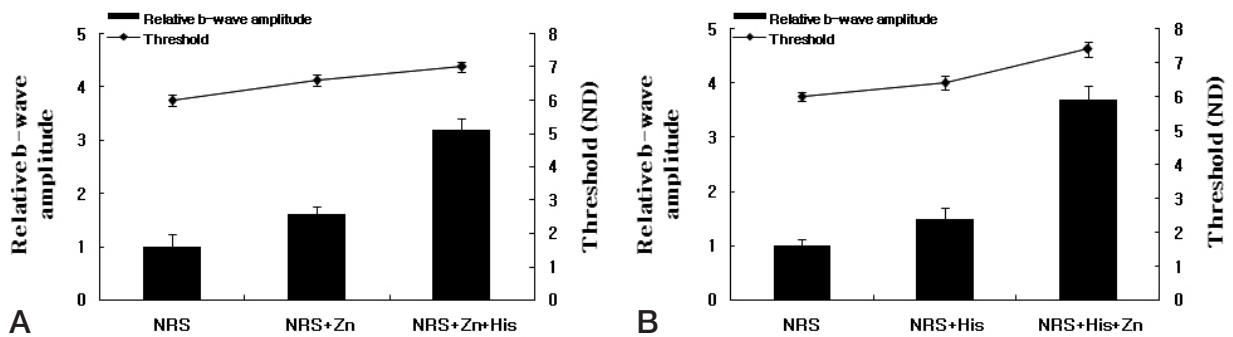


Fig. 6. The change of relative b-wave amplitude and threshold according to treatment with zinc and histidine. There were increases of both b-wave and threshold after treatment with either zinc or histidine in addition to NRS; and also after treatment with both ZnCl₂ and histidine, regardless of the order of treatment.

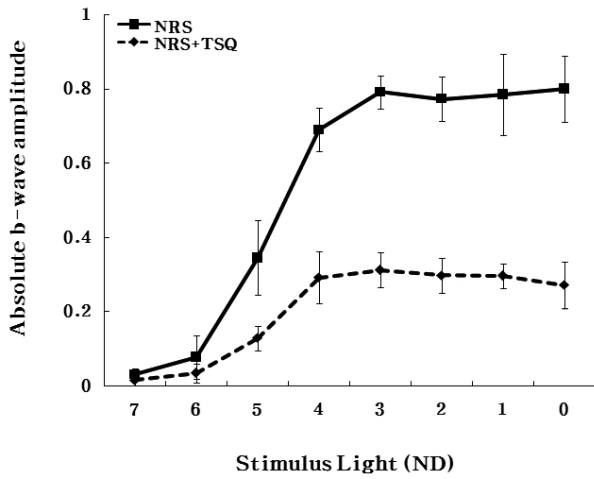


Fig. 7. The change of absolute b-wave amplitude according to the increase of stimulus light after the treatment with TSQ, a chelate of zinc, in addition to NRS.

가 아연의 킬레이트트로 작용한 것이다(Fig. 8 A). 또한 NRS에 ZnCl₂와 TSQ, histidine을 처리한 후 자극광(ND 2)을 주어 상대적인 b-wave amplitude와 threshold를 측정하였다. NRS에 ZnCl₂를 처리하였을 때 b-wave와 threshold가 증가하였으며, TSQ를 처리한 후에는 b-wave와 threshold가 감소하였다. TSQ가 아연에 대하여 킬레이트트로 작용한 것이다. Histidine 처리 시 TSQ의 영향으로 b-wave가 감소하는 것을 방지하기 위하여 TSQ 처리 후 5분 간격으로 자극광(ND 2)을 주어 b-wave amplitude를 측정하였다. TSQ처

리 후 35분부터는 b-wave의 변화가 거의 없었으므로, 이때 histidine을 처리하여 b-wave와 threshold를 측정한 결과 변화가 거의 없었다. 이는 histidine이 아연의 킬레이트트로 작용하지 않았음을 다시 확인할 수 있는 결과이다(Fig. 8B).

7. 로돕신 regeneration time 측정

다양한 강도의 배경광을 5분 동안 쬐서 안구를 명순응시킨 후, 배경광을 끄고 동시에 자극광(ND 2)을 30초 간격으로 주어 threshold가 나타나는 시간을 측정하였다. 아연과 histidine을 처리하였을 때 regeneration time이 짧아지는 경향을 보였으며, 아연과 histidine을 함께 처리하였을 때 조금 더 짧아짐을 볼 수 있었다. 이는 아연이 retinol dehydrogenase에 결합함으로써 regeneration이 가속화되었기 때문이다. TSQ 처리 후에는 regeneration time이 연장되었다. 이러한 결과는 TSQ가 아연의 킬레이트트로 작용하여 regeneration을 지연시켰기 때문이다(Fig. 9).

8. 아연과 histidine 처리에 따른 흡광도 변화

아연과 histidine 처리에 따른 암순응과 명순응 상태에서 흡광도를 측정하였다. NRS에 아연 또는 histidine을 처리했을 때 암순응에서 NRS만 처리했을 때에 비해 흡광도 값이 증가하였으며, 명순응에서도 아연 또는 histidine을 처리했을 때 흡광도 값이 증가하였다. 암순응에서는 흡광도 증가가 명순응보다 훨씬 크게 나타났다. 이러한 결과는 아연

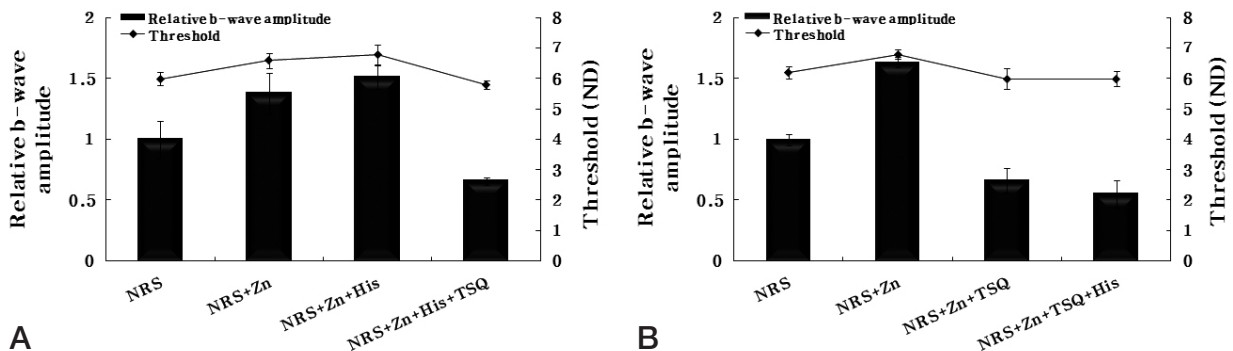


Fig. 8. Measurement of relative b-wave amplitude and threshold in the presence of the stimulus light ND2 after the treatment of ZnCl₂, histidine and TSQ in addition to NRS. (A) The decrease of b-wave and threshold after TSQ treatment showed that TSQ acted as the chelate of zinc. (B) There was almost no change of b-wave and threshold when TSQ treatment was followed by histidine treatment.

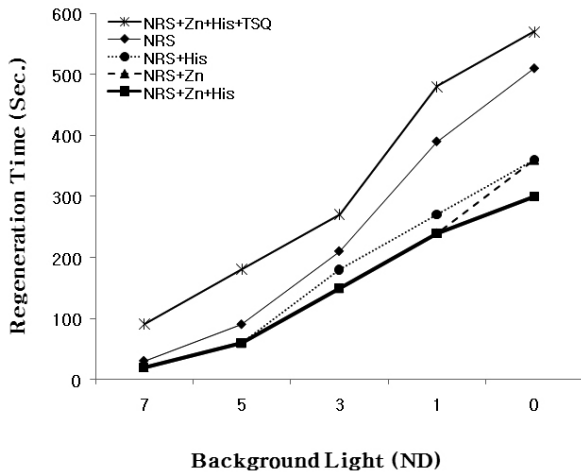


Fig. 9. Measurement of rhodopsin regeneration time. There was a shortening tendency of regeneration time after treatment with NRS, NRS+Zn, NRS+His or NRS+Zn+His. However, regeneration time was prolonged after treatment with NRS+Zn+His+TSQ.

과 histidine이 NRS에 첨가됨으로써 광자극시 로돕신 탈색에 대한 방어 작용을 함을 의미한다(Fig. 10 A, 10B).

고찰

일반적인 척추동물 망막에서의 아연은 microligand에 결합하여 맥락막의 Bruch's membrane을 통하여 확산되어 망막 색소 상피 세포로 이동한다. 망막 색소 상피 세포로 이동한 아연은 metallothionein (MT)이나 melanin과 결합하여 neuroretina로 이동하고, 광자극에 의한 막대 세포 외분절 (rod outer segment, ROS)의 작용에 의해 결합되어 있던 아연이 분비되어 세포질내의 유리 아연 농도가 증가된다. 한편 세포내 항상성 유지를 위해 neuroretina로부터 아연은 계속 유입되면서 광수용체의 내분절로 이동한 후 새로 생성된 원형질막원반과 융합한다. 광수용체 외분절의 식세포작용이 일어나서 망막 색소 상피 세포나 광수용체로부터 아연의 누출이 일어나고, 누출된 아연은 NMDA 수용체나 calcium-permeable non-NMDA 수용체를 경유하여 신경절 세포내로 들어가서 glycine 수용체나 GABA_A 수용체의 작용

을 증진시키거나 NMDA glutamatergic 수용체의 작용을 저해한다. 또한 밀러 세포내로 유입된 아연은 GABA 대사를 저해함으로써 밀러 세포와 다른 신경세포들 간의 GABA-glutamine shuttle에 영향을 미치며, 세포내 고농도의 아연은 미토콘드리아의 기능을 변경시키고 ROS 형성을 촉진한다. 이상의 다양한 수송 경로를 통하여 아연은 이동하는데 (Ugarte와 Osborne, 2001; Redenti와 Chappell, 2005), 이렇게 수송되어진 아연은 망막과 망막 색소 상피 세포에서 항산화제로써 작용하며, 광수용체에서는 비타민 A, 타우린과도 상호 작용한다. 또한 광자극에 대한 로돕신의 반응을 조절하며, retinal synaptic transmission을 조절하고, 광수용체의 원형질막원반을 변형시키는데 관여하고 있다(LeureduPree, 1981; Truong-Tran 등, 2000; Akagi 등, 2001).

망막의 밀러 세포에는 일반적인 중추 신경계에서와는 다르게 GABA_A 수용체만이 존재한다. GABA가 밀러 세포의 GABA_A 수용체에 결합하면 Cl⁻의 유입이 발생하는데, GABA_A 수용체에 있는 여러 가지 inhibitor들이 결합 부위에 결합함으로써 Cl⁻의 유입을 차단한다. 그 중의 하나로 아연이 아연 결합 부위에 결합하면 Cl⁻의 유입을 감소시킴으로써 상대적으로 b-wave를 증가시킨다.

본 실험에서는 시각 감수성에 대한 아연의 효과와 아연에 대한 특이성을 가진 킬레이트로서 TSQ, histidine을 처리해 봄으로써 망막전위도 측정이나 흡수 스펙트럼 실험의 결과들이 순수한 아연의 효과인지를 확인하였으며 그 결과는 다음과 같았다.

첫째, 적정 농도의 아연 처리 후 자극광을 증가시킴에 따라 ERG b-wave와 threshold가 증가하였다. Histidine 또한 자극광을 증가시킴에 따라 ERG b-wave와 threshold가 증가하였다. 이는 아연과 histidine이 visual adaptation에 관여함을 나타내는 결과로, 1) 아연 결핍 시 시각계에 나타나는 여러 증후군과 레티놀 탈수소효소와의 연관성을 보고한 선행연구를 참고할 때, 아연이 밀러 세포의 세포막 안으로의 유입이 레티놀 탈수소효소와 포스포디에스테라아제의 활성을 증진시킴으로써 로돕신 재생을 촉진하여 시각 감수성을 증대시킨 결과라고 할 수 있다(Ugarte와 Osborne, 2001; Christian와 West, 1998). 2) Histidine은 세포막에 대한 투과성이 없어서 세포의 공간의 free Zn²⁺와 반응하여 아연의

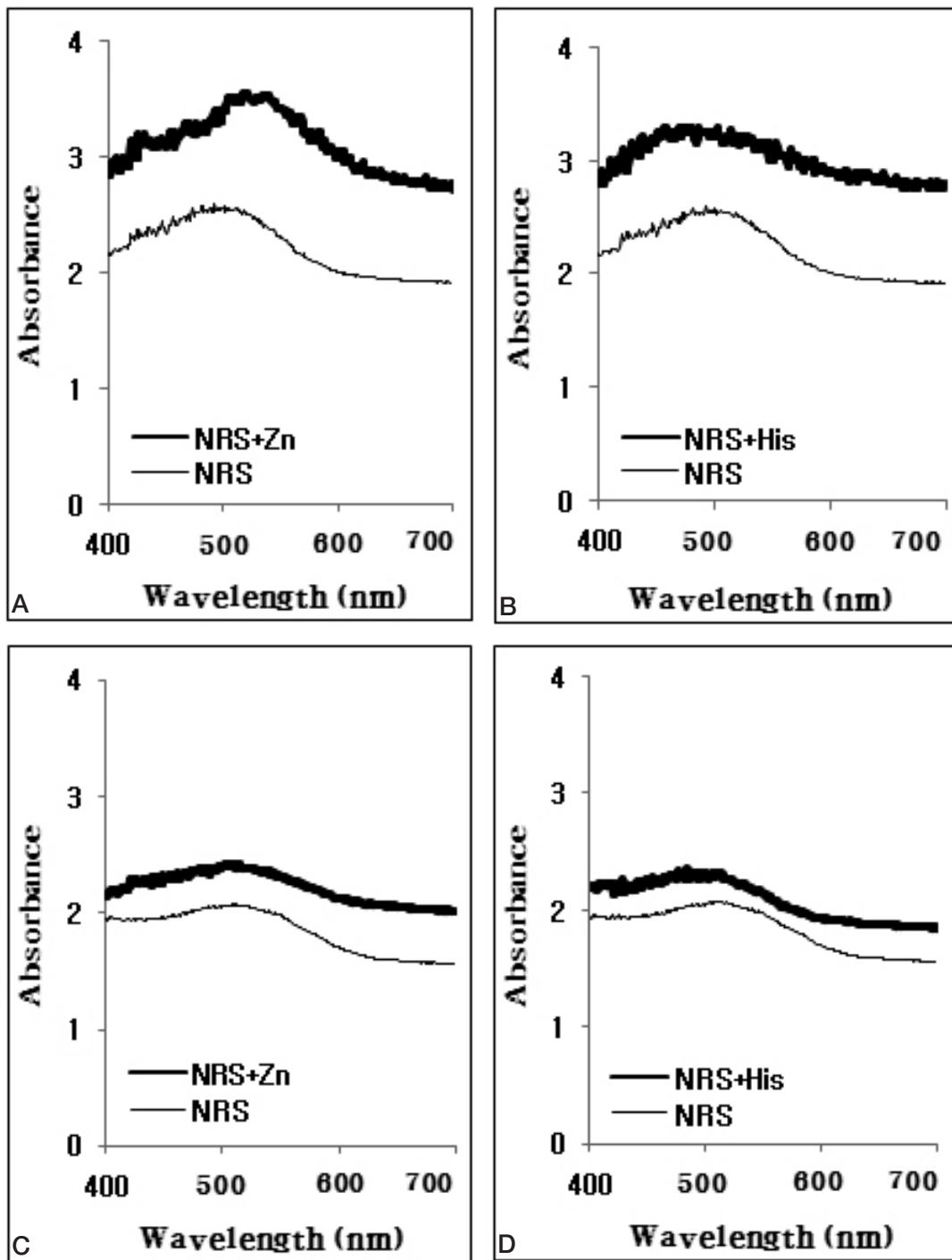


Fig. 10. The change of absorbance after treatment with $ZnCl_2$ or histidine in addition to NRS during (A) dark adaptation or (B) light adaptation after the exposure to the background light ND 0. Treatment with either zinc or histidine in addition to NRS resulted in the increase of absorbance in both cases of dark adaptation and light adaptation.

킬레이트로 작용하고, ERG b-wave의 감수성을 증가시킨다고 보고되어 있다(Redenti와 Chappell, 2004; Rosenstein

와 Chappell, 2003). 따라서 histidine이 아연의 킬레이트로써 작용하는지는 좀 더 확인해 볼 필요가 있으며(Qian 등,

1996; Rosenstein와 Chappell, 2003; Redenti와 Chappell, 2004; Redenti와 Chappell, 2007), 아연의 킬레이트보다는 아연과 마찬가지로, 밀러 세포의 후시냅스에서 Cl^- 의 유입을 차단하는 GABA 수용체의 inhibitor로 작용했을 것으로 사료된다.

둘째, 아연의 킬레이트인 TSQ를 처리했을 때 밀러 세포에서 ERG b-wave와 threshold가 감소하였으며 광수용체에서 로돕신의 regeneration time이 길어졌고 a-peak 흡광도가 감소하였다. 이는 아연의 킬레이트들이 대부분 다른 2가 양이온들에 대한 특이성이 없는 것이 대부분이나, TSQ는 Ca^{++} 이나 Mg^{++} 의 존재 하에서도 Zn^{++} selective probe로 작용하여 세포외에 존재하는 아연을 킬레이트시킴으로써, 결국 세포내로의 아연 유입 농도를 감소시킴으로써 일어나는 결과이다(Frederickson 등, 1987). 따라서 망막전위도 기록이나 흡수스펙트럼 실험 결과에서 나타났던 아연 처리에 의한 시각 감수성 증진이 순수한 아연 효과임을 확인 할 수 있었다.

셋째, 아연 처리 후 로돕신 regeneration time이 짧아졌으며, 광수용체에서의 a-peak 흡광도가 증가하였다. 일반적으로 로돕신은 광 노출에 의해 흡광도가 감소하는 성질이 있으므로, 실험군에서 나타난 regeneration time 감소와 흡광도 증가는 적정 농도의 아연 처리가 retinol dehydrogenase에 결합함으로써 로돕신의 regeneration을 가속화시켜 광 노출에 의한 망막의 탈색에 대한 방어효과가 있음을 시사한다(Park, 1982). 한편 histidine 처리 후에도 로돕신 regeneration time이 짧아졌으며, 광수용체에서의 a-peak 흡광도가 증가하였다. Histidine 첨가에 의한 regeneration time의 가속화와 a-peak 흡광도의 증가는 앞으로 조금 더 연구해야 할 과제로 남아 있다.

참고문헌

- Akagi T, Kaneda M, Ishii K, Hashikawa T. Differential subcellular localization of zinc in the rat retina. *J Histochem Cytochem*. 2001, 49:87-96.
- Bertini I, Luchinat C, Maret W, Zeppezauer M. Zinc enzymes (Progress in Inorganic Biochemistry and Biophysics), Vol 1. Ed. by Gray H, Bertini I, 1986, p1-15. Birkhäuser, Boston.
- Bhagavan NV. Medical biochemistry. Ed. by Bhagavan NV. 1991, p880-883. Jones and Bartlett publishers, Boston.
- Christian P, West KP Jr. Interactions between zinc and vitamin A: an update. *Am J Clin Nutr*. 1998, 68(2 Suppl):435S-441S.
- Frederickson, CJ, Kasarskis, EJ, Ringo, D, Frederickson, RE. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J Neurosci Method*. 1987, 20:91-103.
- Grahn BH, Paterson PG, Gottschall-Pass KT, Zhang Z. Zinc and the eye. *J Am Coll Nutr*. 2001, 20:106-118.
- Kim HJ, Kim YY. Effect of zinc on the visual sensitivity of the bullfrog's eye. *Korean J Ophthalmol*. 2000, 14:53-59.
- Kim HJ, Kim YY. Synergism between zinc and taurine in the visual sensitivity of the bullfrog's eye. *J Photosci*. 2000, 7:115-121.
- Leure-duPree AE. Electron-opaque inclusions in the rat retinal pigment epithelium after treatment with chelators of zinc. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981, 21:1-9.
- Park JS, Kim HY, Kim YY. Effect of zinc and Hypothermic Process during the Light and Dark Adaptation of Vertebrate Retina. *Korean J Ophthalmol Soc*. 2007, 48:969-979.
- Park WL. Relation of bleaching to sensitivity of vertebrate photoreceptors. *Methods Enzymol*. 1982, 81:423-31.
- Prasad AS, Fitzgerald JT, Hess JW, Kaplan J, Pelen F, Dardenne M. Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition*. 1993, 9:218-224.
- Qian H, Malchow RP, Chappell RL, Ripps H. Zinc enhances ionic currents induced in skate Müller (glial) cells by the inhibitory neurotransmitter GABA. *Proc Biol Sci*. 1996, 263:791-796.
- Redenti S, Chappell RL. Localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) in mouse retina. *Vision Res*. 2004, 44:3317-3321.
- Redenti S, Chappell RL. Neuroimaging of zinc released by depolarization of rat retinal cells. *Vision Res*. 2005, 45:3520-3525.
- Redenti S, Chappell RL. Müller cell zinc transporter-3 labeling suggests a role in outer retina zinc homeostasis. *Mol Med*. 2007, 13:376-379.
- Rosenstein FJ, Chappell RL. Endogenous zinc as a retinal neuromodulator: evidence from the skate (Raja erinacea). *Neurosci Lett*. 2003, 345:81-84.
- Roth HP, Kirchgessner M. Zn metalloenzyme activities. Changes and biochemical aspects in Zn deficiency. *World Rev Nutr Diet*. 1980, 34:144-160.
- Sawada M, Nishikawa M, Adachi T, Midorikawa O, Hiai H, A Paneth cell specific zinc-binding protein in the rat. Purifica-

- tion and immunohistochemical localization. *Lab Invest* 1993, 68:338–344.
20. Terhune MW, Sandstead HH. Decreased RNA polymerase activity in mammalian zinc deficiency. *Science* 1972, 177:68–69.
21. Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Zalewski PD. Visualization of labile zinc and its role in apoptosis of primary airway epithelial cells and cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279:L1172–L1183.
22. Ugarte M, Osborne NN. The localization of free zinc varies in rat photoreceptors during light and dark adaptation. *Exp Eye Res*. 1999, 69:459–461.
23. Ugarte M, Osborne NN. Zinc in the retina. *Prog Neurobiol*, 2001, 64:219–249.