

시스플라틴에 의한 LLC-PK₁의 알파-메틸글루코스 흡수 감소 기전

서경원* · 김효정 · 정세영*
식품안전본부 독성부, *경희대학교 약학대학
(Received August 23, 1996)

Mechanism of Inhibition of α -Methylglucose Uptake by Cisplatin in LLC-PK₁

Kyung Won Seo*, Hyo Jung Kim and Se Young Choung*
Department of Toxicology, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020, Korea
*College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—We have previously shown that determination of glucose uptake using α -methylglucose(α -MG) is very sensitive and rapid parameter for the assessment of loss of cellular function in renal cell line(LLC-PK₁). The present study was designed to elucidate the mechanism of inhibition of α -MG uptake and the intracellular site of toxic action of cisplatin(CIS). LLC-PK₁ cells were exposed to various concentrations(5 μ M~100 μ M) of CIS for 5 hrs or 24 hrs and α -MG uptake was determined. Mitochondrial function was evaluated by measuring intracellular ATP content and MTT reduction. The activities of marker enzymes for the basolateral membrane(Na⁺-K⁺ ATPase) and brush border membrane (alkaline phosphatase: ALP) were also measured. CIS treatment significantly inhibited the α -MG uptake in a time- and dose-dependent manner above 25 μ M for 5 hrs. Intracellular ATP content and MTT reduction were affected by 24 hr-treatment of 50 μ M CIS. The activities of Na⁺-K⁺ ATPase and ALP were significantly decreased at 10 μ M and 5 μ M of CIS for 24 hrs, respectively. The incubation with CIS for 5 hrs had no effects on the intracellular ATP content, MTT reduction and the activities of marker enzymes up to 100 μ M. These results partly indicate that inhibition of α -MG uptake by CIS may not be attributed to the disturbance of mitochondrial function or inhibition of the activity of Na⁺-K⁺ ATPase and can be resulted from direct effect of CIS on the Na⁺/glucose cotransporter in brush border membrane. This study shows that additional mechanistic information, indicating the intracellular site of nephrotoxic action, can be gained by coupling the α -MG uptake and ATP content or the activity of Na⁺-K⁺ ATPase.

Keywords □ Cisplatin, LLC-PK₁, α -Methylglucose uptake.

신장은 기능적, 형태학적 그리고 생화학적으로 현저하게 상이한 여러 형태의 세포들로 구성되어 있으며 고도로 분화되어 있는 장기이다. 많은 신장독성 물질들이 주로 신장에만 특이적으로 독성을 유발하는데 그 이유는 신장이 독성물질에 대한 특정부위의 감수성, 독성물질의 능동 수송과 농축시키는 능력, 독성이 더 강한 물질로 대

사시킬 수 있는 능력을 가지고 있기 때문이라 할 수 있다. 특히 신장의 근위세뇨관은 여러가지 유기, 무기 화합물에 대한 능동 수송능과 광범위한 약물대사능으로 인하여 많은 신장 독성물질의 1차적 표적부위가 되고 있다.

최근 세포배양을 이용한 기법이 독성시험 전반에 적용되고 있으며, 신장독성 분야에서도 세포주 등을 이용한 *in vitro* 독성시험법이 개발되고 있다. 신장 세포주는 여러가지가 개발되어 있는 데, 특히 돼지 신장의 상피 세포주인 LLC-PK₁은 각 세포가 서로 강력하게 연결되

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-350-3311-2 (팩스) 02-352-9664

어 있으며, 염과 물을 한쪽 방향으로 이동시키는 능력을 가지고 있고 특징적인 dome을 형성한다.^{1, 3)} LLC-PK₁은 또한 근위 세뇨관에서 보이는 Na⁺-dependent active sugar transport system도 보유하고 있으며^{4, 6)}, 근위 세뇨관의 지표효소를 비교적 높은 양으로 함유하고 있다.⁷⁾ 따라서 LLC-PK₁은 이러한 특성 때문에 일부 신장 상피세포 기능 평가에 유용하게 사용되고 있다.

본 연구자 등은 α -methylglucose(α -MG)를 이용한 glucose uptake 기능 측정법이 LLC-PK₁에서 시스플라틴, HgCl₂ 및 CdCl₂ 등 신장독성물질의 독성을 기존의 *in vitro* 독성지표인 효소유리 측정법이나 트립판 블루 염색법에 비하여 조기에 검색할 수 있는 유용한 지표임을 보인바 있다.⁸⁾

본 연구에서는 신장독성물질인 시스플라틴을 사용하여 α -MG uptake 측정과 함께 세포내 ATP 양, Na⁺-K⁺ ATPase의 활성, Na⁺/glucose cotransporter가 존재하는 apical membrane의 지표효소인 alkaline phosphatase의 활성변화 등 glucose uptake와 관련된 기능들을 측정함으로써 신장의 독성표적부위와 독성유발기전을 규명하여 보고자 하였다.

실험방법

시약 및 재료

시스플라틴, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), alkaline phosphatase(ALP) assay kit, ATP assay kit와 phosphorus assay kit는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)으로부터 구입하였으며, α -[¹⁴C] methylglucose는 Amersham International PLC(Amersham U.K.)로부터 구입하였다.

LLC-PK₁의 세포배양 및 약물처리

LLC-PK₁ 세포는 American Type Culture Collection(ATCC CRL-1392)으로부터 195 세대를 분양받아 197~200 세대를 사용하였다. 배지는 3% fetal bovine serum(FBS), 페니실린(100 U/ml)과 스트렙토마이신(100 μ g/ml)이 포함된 medium 199를 사용하였으며, 3~4일마다 계대배양 하였다. 접종후 4일째에 배지를 교환한 후 시스플라틴을 0, 5, 10, 25, 50, 100 μ M 의 농도로 처리하여 5 시간 또는 24 시간

동안 배양하였다.

α -Methylglucose uptake의 측정

세포를 culture dish(60×15 mm)에 배양 후 시스플라틴으로 처리하고 Hanks-HEPES buffer(pH 7.4)로 2번 세척한 후 2.5%(w/v) BSA와 [¹⁴C] α -methylglucose(1.0 Ci/ml)가 함유된 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(pH 7.4)로 배양하였다. Uptake가 끝나는 시점에 세포를 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(4°C)로 3번 세척하고 2 N NaOH 1 ml를 가하여 37°C에서 2시간 동안 방치시켜 세포를 용해하였다. 용해된 세포의 일부는 Insta-Gel XF(Packard, Downers Grove, Illinois, USA)를 사용하여 liquid scintillation counter로 방사능량을 측정하고 일부는 단백질 정량에 사용하였다.

세포내 ATP 함량 측정

세포를 culture dish(60×15 mm)에 배양하여 시스플라틴을 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 세척하고 12% trichloroacetic acid(4°C, TCA)를 500 μ l 가하여 세포를 모은 후 500 μ l의 TCA를 더 가하여 첫번째 것과 혼합하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 모아서 12 M KOH로 중화하여 ATP 측정에 사용하고 침전은 1 M NaOH로 가수분해 후 단백질을 정량하였다.

ATP 양은 Sigma kit를 이용하여 Adams의 방법⁹⁾으로 측정하였다. 0.3 mg NADH에 18 mM 3-phosphoglyceric acid 1 ml, 물 1.5 ml와 상등액 0.5 ml를 가한후 물을 reference로 하여 340 nm에서 초기 흡광도를 측정하였다. 반응액에 0.04 ml의 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase/phosphoglycerate phosphokinase 효소 혼합액을 가하여 물을 reference로 하여 340 nm에서 최소 흡광도에 도달할 때까지 흡광도를 측정하였다. ATP 함량은 최초 흡광도와 최종 흡광도 차이로부터 구하였다.

MTT assay

세포를 24 well plate에 접종하여 배양한 후 시스플라틴으로 처리하였다. 시험물질 처리 후 1 ml의 새로운 배지로 교환하고 1 ml의 phosphate buffered saline에 MTT 5 mg이 용해된 시약을 well 당 100 μ l를 가한 후 37°C에서 3 시간동안 배양하였다. 배양 후 1800 rpm에

서 5분간 원심분리하여 배지중 800 μ l를 제거하고 200 μ l만 남긴 후 dimethyl sulfoxide 1 ml를 가하여 생성된 formazan을 녹였다. 이 용액을 96 well plate에 옮기고 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 630 nm(reference wavelength)와 570 nm(test wavelength)에서 흡광도를 측정하였다.

세포 현탁액의 조제

세포를 culture dish(60 \times 15 mm)에 배양하여 시스플라틴을 처리한 후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2번 세척하였다. 세포를 5 mM Tris-HCl과 0.9% NaCl이 함유된 PBS 500 μ l로 harvest 한 후 초음파 분쇄기(60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific Co.)로 level 7에서 1분간 분쇄하고, 5000 rpm에서 5분동안 원심분리후 상등액을 효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

Na⁺-K⁺ ATPase 활성 측정

Na⁺-K⁺ ATPase 활성은 Schoner¹⁰⁾의 방법으로 pyruvate kinase가 관여하는 반응을 이용하여 측정하였다. 일정량의 세포 현탁액을 3 mM MgCl₂, 3 mM ATP, 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 30 mM histidine이 함유된 반응액에서 30분간 반응시킨 후 25% TCA 1 ml로 반응을 종결시키고, 3000 g에서 10분간 원심 분리후 상등액을 취하여 Fisk-Sabbarow 등의¹¹⁾ 방법으로 ATP로부터 유리되는 무기인을 Sigma kit를 사용하여 정량하였다. Na⁺-K⁺ ATPase 활성은 총 ATPase 활성에서 ouabain으로 억제된 활성을 제외한 값으로 하였다.

ALP의 활성 측정

ALP의 활성은 Bowers와 McComb의 방법¹²⁾에 따라 측정하였다. 16 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 4 mM magnesium ion이 함유된 Sigma kit 반응액에 세포 현탁액을 가하여 반응을 시작시키고 405 nm에서 1분간 흡광도를 측정하여 흡광도 변화로부터 ALP의 활성을 측정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 bovine γ -globulin을 표준 물질로 하여 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 Bradford 법¹³⁾으로 정량하였다.

통계처리 및 분석

모든 실험은 triplicate로 행하였으며 독립된 세 번 이상의 실험을 통해 같은 경향을 나타낸 결과 중 대표적인 실험의 값을 취하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 또 각 군간의 유의성 검증을 위해 Student's t-test를 실시하였고 p값이 0.05이하인 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

실험결과

시스플라틴이 α -methylglucose uptake에 미치는 영향

α -MG를 이용하여 시스플라틴이 glucose uptake에 미치는 영향을 보았다. 시스플라틴을 처리한 결과 α -MG uptake는 용량과 처리시간 의존적으로 감소하였다(Fig. 1과 Fig. 2). 시스플라틴을 25 μ M과 50 μ M 농도로 5시간 동안 처리한 결과 α -MG uptake가 각각 대조군의 68%와 53%로 유의성있게 감소하였다. 시스플라틴을 24시간 처리한 경우에는 5 μ M 농도부터 α -MG uptake가 감소하였으며 25 μ M 처리에 의하여는 대조군의 50%까지 감소하였다.

시스플라틴에 의한 α -MG uptake 감소기전

시스플라틴에 의한 α -MG uptake 감소의 원인으로 는 미토콘드리아의 기능저하, Na⁺-K⁺ ATPase의 활성저하 및 Na⁺/glucose cotransporter에 대한 직접

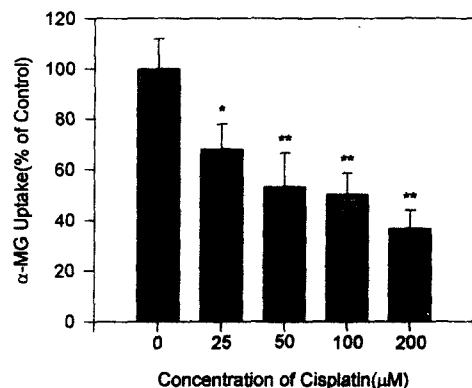


Fig. 1 — Effect of cisplatin on α -MG uptake. LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 5 hrs. Values are expressed by means \pm S.D.(% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group.

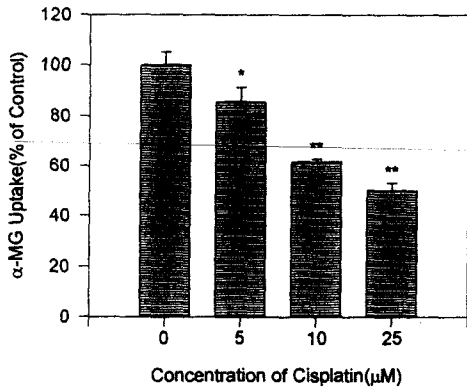


Fig. 2 — Effect of cisplatin on α -MG uptake. LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 24 hrs. Values are expressed by means \pm S.D. (% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group.

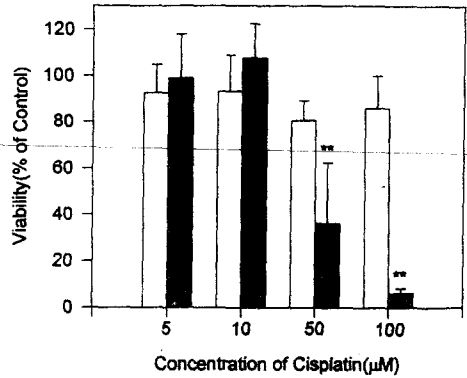


Fig. 4 — Effect of cisplatin on viability as assessed by MTT assay. LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 5 hrs or 24 hrs. Values are expressed by means \pm S.D. (% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences (**: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group. □ : 5 hrs, ▨ : 24 hrs

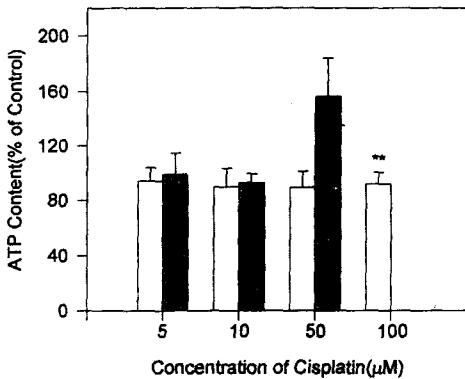


Fig. 3 — Effect of cisplatin on intracellular ATP content. LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 5 hrs or 24 hrs. Values are expressed by means \pm S.D. (% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences (**: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group. □ : 5 hrs, ▨ : 24 hrs

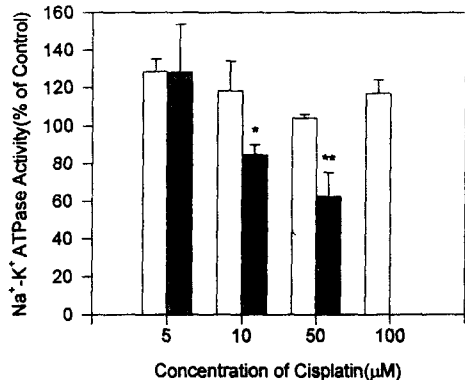


Fig. 5 — Effect of cisplatin on activity of Na⁺-K⁺ ATPase. LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 5 hrs or 24 hrs. Values are expressed by means \pm S.D. (% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group. □ : 5 hrs, ▨ : 24 hrs

억제 작용을 생각할 수 있다. 시스플라틴의 미토콘드리아에 대한 영향을 보고자 세포내 ATP 양을 측정된 결과, 시스플라틴을 5시간 처리한 경우 모든 농도에서 세포내 ATP 양에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 24시간 처리한 경우에도 10 μ M까지는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으나 50 μ M의 농도에서는 오히려 대조군의 150%로 증가하였다(Fig. 3).

시스플라틴의 미토콘드리아에 대한 영향을 평가하는

또 하나의 방법으로 MTT assay를 실시하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. MTT assay 결과 시스플라틴을 5시간 처리한 경우에는 100 μ M까지 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 시스플라틴의 24시간 처리에 의해서는 50 μ M과 100 μ M에서 각각 대조군의 36%와 6%로 크게 감소하였다.

Na⁺-K⁺ ATPase의 활성을 측정된 결과에서는 시스

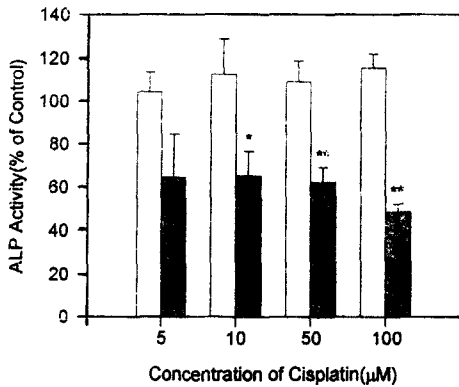


Fig. 6—Effect of cisplatin on ALP activity.

LLC-PK₁ cells were incubated with various concentrations of cisplatin for 5 or 24 hrs. Values are expressed by means \pm S.D. (% of control) of three separate experiments. Asterisks indicate significant differences (*: $p < 0.01$, Student's t-test) from control group.
□: 5 hrs, ■: 24 hrs

플라틴을 5시간 처리한 경우 100 μ M의 농도까지 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 시스플라틴을 24시간 처리한 경우에는 10 μ M의 농도에서 대조군의 85%, 50 μ M의 농도에서는 63%로 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성이 용량 의존적으로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

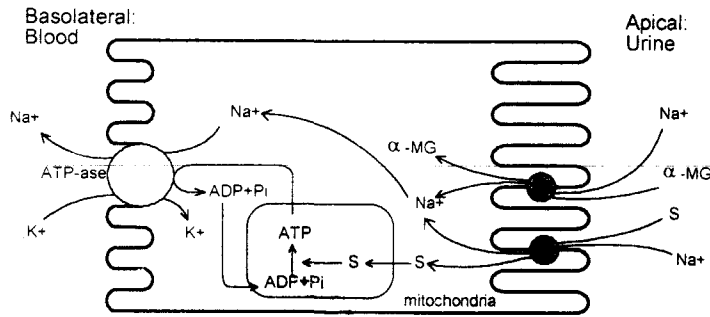
시스플라틴에 의한 α -MG uptake 저하가 Na⁺/glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용에 의한 것인지를 보고자 brush border membrane의 지표효소인 ALP의 활성을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 시스플라틴의 5시간 처리에 의해서는 100 μ M까지 ALP의 활성에 유의성 있는 변화가 없었다. 24시간 처리시에는 5 μ M 부터 ALP 활성이 감소되었으며 10 μ M 농도부터는 대조군의 65%로 유의성 있는 감소가 관찰되었고 100 μ M에서는 대조군의 50% 까지 감소하였다.

고 찰

현재 *in vivo* 독성시험에서 동물시험을 대체할 수 있는 *in vitro* 독성시험법을 개발하고 있는데 이중 독성물질을 장기간 저농도로 노출할 수 있는 시험계는 세포 배양을 이용한 방법이다. 가장 많이 사용되는 세포배양 시험계는 세포주를 이용하는 것이며, 특히 신장독성 검색에 많이 사용되는 세포주가 LLC-PK₁이다. 본 시험에서도 사용한 LLC-PK₁은 신장의 생리연구에 상당히 중

요하며 신장장애 뿐 아니라 상피세포의 극성, 호르몬의 조절, extracellular matrix의 역할, 분화와 노화의 과정을 규명하는데 큰 공헌을 하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾ LLC-PK₁ 세포주는 monolayer를 형성하고 형태학적 극성을 나타내는데 위쪽은 *in vivo*에서 상피세포의 luminal 또는 mucosal membrane에 해당하고 배양접시에 접촉되어 있는 부분은 basolateral membrane에 해당한다. 이것은 transepithelial Na⁺ transport mechanism의 기능적 극성이 존재하고 있음을 시사한다. 최근 연구에서 배양접시에 면하고 있는 세포막에 [³H] ouabain binding site가 국재되어 있다는 보고가 있었으며, 이는 이 membrane이 *in vivo*에서 basolateral membrane에 해당한다는 증거가 되고 이 세포가 능동수송 등의 기능적 극성을 유지하고 있음을 시사한다.¹⁷⁾

In vitro 독성 검색에서는 상관성이 높고 결과의 판독이 확실하며 신뢰성이 있는 독성지표가 중요하다. 일반적인 *in vitro* 독성 평가의 방법으로는 세포막의 구조가 유지되고 있는지 여부를 평가하는 것이며, 가장 많이 사용되는 방법이 트립판 블루를 사용한 dye exclusion test와 배지내로 유리되는 lactate dehydrogenase (LDH)의 활성을 측정하는 방법으로서, 많은 실험에서 시스플라틴의 독성평가에 이를 사용하였다.¹⁸⁻¹⁹⁾ LDH leakage test가 dye exclusion test 보다 더 유용한데 이는 각 세포의 염색 여부를 현미경으로 확인하는 작업이 용이하지 않기 때문이다. 그러나 이러한 효소 유리 측정법의 가장 큰 단점은 독성 평가가 독성의 마지막 단계인 세포 죽음이 일어난 시점에서 이루어 진다는 것이다. 반면, 효소 유리측정법에 비하여 세포 죽음이 일어나기 전에 나타나는 세포 기능 이상을 볼 수 있는 지표도 있다. 세포 기능을 보는데 예민한 지표로서는 세포내 ATP, K⁺과 Na⁺의 양과 산소 소비량 측정법이 있다. 이러한 지표들이 초기의 세포 기능 이상을 검색할 수 있는 지표이기는 하나 근위세뇨관 세포 뿐 아니라 모든 세포에 일반적인 기능이며, 따라서 하나 이상의 세포가 혼합되어 있는 경우 특정 세포의 독성을 평가하기는 어렵다.²⁰⁻²¹⁾ 이러한 문제점은 근위세뇨관의 특이 기능을 측정함으로써 해결될 수 있다. 본 연구자들은 신장 근위세뇨관의 특이 기능인 glucose uptake 기능이 *in vivo*에서 근위세뇨관 독성 초기에 장애받는다라는 보고가 있어²²⁾, 이를 *in vitro*에서 신장독성의 지표로서 활용하고자 하였으며, 그 결과 α -MG를 이용한 glucose uptake 측정법이 기존의 *in vitro* 독성 지표에 비하여 신장독성을 조기에



ATP is a driving force for the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase which creates a sodium gradient across the cell membrane, allowing Na^+ /glucose cotransport to proceed as a secondary active transport process. The intracellular ATP concentration depends on the oxidative phosphorylation in the mitochondria, which is dependent on functional integrity of this system and substrate(S) availability.

Scheme 1 — Schematic representation of a proximal tubular cell indicating functional relationship between intracellular ATP concentration and α -MG uptake.

검색할 수 있는 지표임을 보인 바 있다.⁸⁾

본 실험에서는 세포배양계에서 α -MG uptake 측정과 함께 glucose uptake와 관련된 여러 기능들을 평가함으로써 독성물질의 표적 부위와 독성유발기전을 규명하여 보고자 하였으며, 신장독성물질로는 시스플라틴을 사용하였다. α -MG를 이용한 glucose uptake 측정 결과 시스플라틴의 처리에 의하여 농도와 배양시간 의존적으로 α -MG uptake의 감소가 관찰되었다.

α -MG는 apical membrane에 있는 Na^+ /glucose cotransporter를 경유하여 근위세뇨관으로 흡수되며 이것은 basolateral membrane에 존재하는 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase에 의하여 유지되는 sodium gradient에 의존한다. 또한, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase의 활성은 세포내 ATP 농도에 의존하며 이는 미토콘드리아 기능에 좌우되고, 따라서 만약 이러한 과정중 한 부분이라도 장애가 일어나면 α -MG uptake가 영향을 받게 된다. 즉, 독성물질에 의한 α -MG uptake의 감소는 독성물질이 Na^+ /glucose cotransporter 또는 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase에 영향을 미쳐서 나타날 수 있으며, 미토콘드리아 기능에 장애를 유발하여 세포내 ATP 양이 부족하여 유발될 수 있다(Scheme 1).

시스플라틴에 의한 α -MG uptake 감소가 미토콘드리아의 기능 억제에 의한 것인지를 보고자 측정된 세포내 ATP의 양은 시스플라틴 5시간 처리에 의해서는 100 μM 까지 변화가 없었으며, 24시간 처리시에는 10 μM 까지 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았고, 50 μM 에서는 오히려 증가하였다. 미토콘드리아의 기능을 볼 수 있는 또 다른 지표로서 미토콘드리아의 지표효소

인 succinate dehydrogenase의 활성을 보고자 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아내 succinate dehydrogenase의 활성을 측정하여 세포의 viability를 평가하는 방법으로 LDH leak test와 함께 *in vitro* 독성검색 지표로 널리 사용된다. 시스플라틴 5시간 처리에 의해서는 100 μM 까지 영향이 관찰되지 않았고, 24시간 처리에 의해서는 50 μM 부터 감소가 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 시스플라틴에 의한 α -MG uptake 감소현상은 시스플라틴이 미토콘드리아의 기능을 저하시킴으로써 유발된 것은 아닌 것으로 판단되었다.

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase의 활성 측정결과에서는 시스플라틴 5시간 처리시에는 100 μM 까지 변화가 없었으며, 24시간 처리에 의해서는 10 μM 부터 유의성 있는 활성 저하가 관찰되었다. 그러나 시스플라틴에 의한 α -MG uptake 감소현상이 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성저하보다 선행하므로 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성저하가 α -MG uptake 감소에 부분적으로 관련이 있으나 직접적인 원인은 아닌 것으로 생각되었다. 또한 시스플라틴 50 μM 의 24시간 처리시 세포내 ATP의 양이 증가한 현상은 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase의 활성저하에 따른 ATP 소모량 감소에 의한 것으로 생각되었다.

시스플라틴에 의한 α -MG uptake 저하의 또 다른 원인으로 Na^+ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용을 생각할 수 있다. α -MG의 uptake가 일어나는 Na^+ /glucose cotransporter는 brush border membrane에 존재하며 이 membrane의 지표효소는 alkaline phosphatase이므로 시스플라틴의 이 부분에

대한 영향을 간접적으로 살펴보고자 ALP의 활성을 측정하였다. 시험결과 시스플라틴의 5시간 처리에 의해서는 ALP의 활성에 유의성 있는 변화가 없었고 24시간 처리시에는 $5 \mu\text{M}$ 부터 ALP 활성 감소가 관찰되었다. 이러한 결과로부터 시스플라틴은 basolateral membrane과 미토콘드리아에 대한 영향보다는 brush border membrane에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며, 따라서 시스플라틴에 의한 α -MG uptake의 저하는 brush border membrane에 존재하는 Na^+ /glucose cotransporter에 대한 직접 억제작용이 더 크게 기여한 것으로 추측되었다.

Halabe 등은 *in vivo*로 시스플라틴에 만성 노출시킨후 신장의 brush border membrane vesicles을 이용한 실험에서 이 약물이 glucose와 phosphate transport에 직접 영향을 미친다고 보고하였다.²³⁾ 또한 최근 연구에서는 시스플라틴에 의해 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 apical membrane의 유동성이 변화하고, 지질의 물리적 상태 변화가 phosphate와 glucose carrier의 조절에 영향을 미칠 수 있으며²⁴⁾, 이러한 carrier에 대한 영향은 시스플라틴에 의해 유발되는 membrane lipid peroxidation의 결과일 수 있다고 보고된 바 있다.²⁵⁾ 본 시험에서는 Na^+ /glucose cotransporter에 대한 시스플라틴의 직접 작용을 조사하지는 못하였으나 이러한 보고와 실험결과를 종합하여 보았을 때, 시스플라틴에 의한 α -MG uptake의 감소 현상은 시스플라틴이 apical membrane에 lipid peroxidation을 유발시킴으로써 Na^+ /glucose cotransporter의 특성을 변화시키고 결국 glucose의 흡수 기능을 저하시키기 때문인 것으로 생각되었다.

결 론

본 실험으로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시스플라틴에 의한 α -MG uptake의 감소는 미토콘드리아 기능 저하 또는 Na^+ - K^+ ATPase 활성 억제보다는 Na^+ /glucose cotransporter에 대한 직접억제작용이 더 크게 관여한 것으로 추측되며,

2. LLC-PK₁의 세포배양계에서 α -MG uptake 측정과 함께 glucose uptake에 관련된 여러 기능을 측정함으로써 신장독성물질의 독성유발기전과 표적부위를 추정하는데 유용하리라 판단되었다.

문 헌

- 1) Hook, J. B., McCormack, M. and Kluwe, W. M. : Biochemical mechanisms of nephrotoxicity. *Rev. Biochem. Toxicol.* **1**, 53 (1979).
- 2) Rush, G. F., Smith, J. H., Newton, J. F. and Hook, J. B. : Chemically induced nephrotoxicity: role of metabolic activation. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 99 (1984).
- 3) Goldstein, R. S. and Schnellmann, R. G. : Toxic responses of the kidney in *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons* 5th ed., Klaassen, C.D.(Ed.), McGraw-Hill, New York, p417 (1996).
- 4) Takahashi, T. and Endou, H. : Intranephron distribution of purine metabolizing enzymes and their participation in pathogenesis of puromycin aminonucleoside nephrosis. *Abs. Int. Cong. Nephrol.* 520 (1987).
- 5) Endou, H., Kimura, K., Nakazima, T., Sudo, J. and Sakai, F., *Abs. VII Int. Cong. Nephrol.* A5 (1987).
- 6) Bekersky, I. : The isolated perfused kidney: a model to study biochemical aspects of nephrotoxicity. *Rev. Biochem. Toxicol.* **7**, 139 (1985).
- 7) Maack, T. : Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int.* **30**, 142 (1986).
- 8) Seo, K. W., Kim, H. J. and Chung, S. Y. : Effect of nephrotoxicants on α -methylglucose uptake in LLC-PK₁. *Kor. J. Environ. Toxicol.* **9**(1-2), 25 (1994).
- 9) Adams, H. : Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase *in Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H. U. (Ed.), Academic Press, New York, p539 (1963).
- 10) Schoner, W., Von Ilberg, C., Kramer, R. and Seubert, W. : On the mechanism of Na^+ - and K^+ -stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. *Eur. J. Biochem.* **1**, 334 (1967).
- 11) Fiske, C.H. and SabbaRow, Y. : Colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).
- 12) Bowers, G. N. and McComb, R. B. : A continuous spectrophotometric method for measur-

- ing the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* **12**, 70 (1966).
- 13) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
 - 14) Striker L. J., Tannen R. L., Lange M. A. and Striker G. E. : The contribution of cell culture to the study of renal diseases. *Int. Rev. Exptl. Pathol.* **30**, 55 (1988).
 - 15) Kreisberg, J. I. and Wilson, P. D. : Renal cell culture. *J. Electr. Micros. Techn.* **9**, 235 (1988).
 - 16) Handler, J. S. : Overview of epithelial polarity. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 729 (1989).
 - 17) Mills, J. W., Macknight, A. D. C., Dayer, J. M. and Ausiello, D. A. : Localization of [³H] ouabain-sensitive Na⁺ pump sites in cultured pig kidney cells. *Am. J. Physiol.* **236**, C157 (1979).
 - 18) Ormsyad, K., Orrenius, S. and Jones, D. P. : Preparation and characteristics of isolated kidney cells. *Methods in Enzymol.* **77**, 137 (1981).
 - 19) Phelps, J. S., Gandolfi, A. J., Brendel, K. and Dorr, R. T. : Cisplatin nephrotoxicity: *In vitro* studies with precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **90**, 501 (1987).
 - 20) Jung, K. Y., Uchida, S and Endou, H. : Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. I. Substrate specificities in the maintenance of ATP content in isolated rat nephron segments. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **100**, 369 (1989).
 - 21) Brand, P. H. and Taylor, B. B. : Lactate oxidation by three segments of the rabbit proximal tubule. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **182**, 454 (1988).
 - 22) Lauwerys, R. and Bernard, A. : Preclinical detection of nephrotoxicity: description of the tests and appraisal of their health significance. *Toxicol. Lett.* **4**, 13 (1989).
 - 23) Halabe, A., Wong, N. L. M. and Sutton, R. A. L. : Effects of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. *Nephron* **57**, 197 (1991).
 - 24) Friedlander, G., LeGrimellec, C. and Amiel, C. : Increase in membrane fluidity modulates sodium-coupled uptakes and cyclic AMP synthesis by renal proximal tubular cells in primary cultures. *Biochim. Biophys. Acta* **1022**, 1 (1990).
 - 25) Hannemann, J. and Baumann, K. : Nephrotoxicity of cisplatin, carboplatin and transplatin. *Arch. Toxicol.* **64**, 393 (1990).