

배양한 토끼 신세뇨관세포에 대한 HgCl₂ 독성*

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

이정용 · 이성범 · 이석형 · 박원상
유 남 진 · 김 상 호 · 김 주 성

HgCl₂ Toxicity on Cultured Renal Tubular Cells of Rabbit

Jung Young Lee, M.D., Seong Beom Lee, M.D., Suk Hyung Lee, M.D.
Won Sang Park, M.D., Nam Jin Yoo, M.D., Sang Ho Kim, M.D.
and Choo Soung Kim, M.D.

Department of Pathology, Catholic University Medical College

To understand the mechanism of cell injury when exposed to HgCl₂, monitoring of cytosolic ionized free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), viability test, measurement of the amount of ATP, and Ca-ATPase activity were evaluated in cultured rabbit renal tubular cells(RTC) exposed to HgCl₂. The results were as follows:

- 1) HgCl₂ was cytotoxic to rabbit RTC at all doses except 10 μM and the rate of killing displayed a dose- and time-dependent relationship.
- 2) The absence of extracellular Ca²⁺ provided partial protection from irreversible injury induced by HgCl₂.
- 3) The increasing pattern of [Ca²⁺]_i varied according to the concentrations of HgCl₂. At the low concentrations of HgCl₂(2.5~10 μM), the level of [Ca²⁺]_i increased slowly over the first 2~3 min and then achieved plateau-state. In contrast, at the high concentrations of HgCl₂(25~100 μM) the level of [Ca²⁺]_i achieved peak within 1 min and then decreased to a plateau state under normal concentrations.
- 4) The level of ATP was decreased to 27.5% of that of normal control cells within 3 min by using a treatment of 100 μM HgCl₂.
- 5) HgCl₂ did not affect the Ca²⁺-ATPase activity by enzyme histochemical observation. These findings suggest that the elevation of [Ca²⁺]_i in response to the HgCl₂-induced injury is an important event in accelerating injury that ultimately leads to cell death. But other possibilities such as HgCl₂ might have direct deleterious effects on the cell also should be considered.
(Korean J Pathol 1995; 29: 615~623)

Key Words: HgCl₂, Injury, Calcium, Ca-ATPase, ATP

접 수:1994년 12월 26일, 게재승인:1995년 2월 8일

주 소:서울시 서초구 반포동 505, 우편번호 137-701

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 이정용

*본 연구는 1992년 가톨릭 중앙의료원 특수연구비 지원으로 이루어짐.

서 론

세포질내에 존재하는 유리 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)은 세포막, 소포체 및 사립체 등에 의해서 아주 낮은 농도($10^{-7}M$)로 조절 유지되고 있으며 세포내 2차 정보전달물질로 작용하고 있다¹. 그러나 세포가 손상을 받으면 이러한 Ca^{2+} 조절기능이 파괴 되면서 $[Ca^{2+}]_i$ 이 정상 생리적 범위를 훨씬 벗어난 높은 농도의 $[Ca^{2+}]_i$ 을 오랫동안 유지하면서 Ca^{2+} 의존성 분해효소들을 활성화시키거나^{2,3} 세포골격 손상⁴ 및 그의 Ca^{2+} 에 관련된 여러기능들이 장애를 일으켜 결국 세포가 죽게 된다고 한다⁵. 그러나 아직도 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화가 모든 세포 손상에 대한 공통적인 반응으로 나타나 다른 후속 변화들을 초래해서 비가역적인 손상으로 이행되는 것인지⁶⁻⁸ 또는 다른 변화 후에 오는 단순한 2차적인 변화인지에⁹⁻¹¹ 대해서는 아직도 논란의 대상이 되고 있다.

$HgCl_2$ 는 신근위세뇨관세포에 비가역적 손상을 일으키는 중금속으로 잘 알려져 있으며¹²⁻¹⁴ $HgCl_2$ 에 의한 세포손상기전 역시 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 관련이 있다는 보고가 있다^{4,6,7,15}. 그러나 저자들마다 측정된 장비나 사용한 세포의 종류에 따라 $HgCl_2$ 의 처치에 대한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가양상 및 시간이 서로 다르며 어떤 경로를 통해 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 일어나는지에 대해서도 아직 이론이 분분하다. 옥과 이는¹⁶ $HgCl_2$ 처치에 대한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 소포체나 사립체에 격리되어있는 Ca^{2+} 이 동원되기보다는 대부분 세포외액에 존재하는 Ca^{2+} 이 손상된 세포막을 통해 대량 유입되기 때문이라고 주장하나 정확히 어느 통로를 통해 들어오는지 에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

한편 $HgCl_2$ 는 -SH기를 가진 단백질에 친화성이 매우 크다고 알려져 있으며 이러한 성질 때문에 세포막에 있는 -SH기를 가진 여러 단백질과 결합함으로써 세포막에 손상을 준다고 여기고 있다⁵. 그러나 세포막에 존재하는 calcium pump(Ca^{2+} -ATPase)도 -SH기를 많이 가지고 있는 효소로서¹⁷ $HgCl_2$ 와 결합하여 calcium pump로서의 기능을 제대로 하지 못해 세포질내에 있는 Ca^{2+} 을 효과적으로 배출하지 못하여 $HgCl_2$ 에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 을 증가시키는데 관여할 가능성이 있으리라 여겨진다.

이에 저자들은 토끼 신세뇨관세포를 분리배양하여 $HgCl_2$ 처치에 따른 세포내 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가양상을 형광분광계(fluorospectrophotometer)로 추적 비교해 보고 아울러 $HgCl_2$ 에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가에 calcium pump 손상이 관련되었는지를 알아보기 위해 Ca^{2+} -ATPase

의 활성도를 효소조직화학적염색을하여 알아보고자 하였으며 또한 $HgCl_2$ 처치에 따른 energy 상태의 변화유무를 측정하여 $HgCl_2$ 에 의한 세포손상기전을 좀 더 명확히 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Eagle's minimum essential medium(MEM), Hanks' balanced salt solution (HBSS), 우태아혈청과 그의 세포배양에 필요한 각종 보충제들은 Gibco Co.(Grand Island, NY, USA)제를 사용하였고 trypsin-EDTA, trypsin inhibitor, collagenase, dispase, deoxyribonuclease (DNAase), Fura2-AM, carbonyl iron, neutral red, $CeCl_3$, $HgCl_2$, levamisole, ouabain, ATP, Bioluminiscent Somatic Cell Assay Kit 등은 Sigma제(St. Louis, MO, USA)를 사용하였으며 arabic gum은 일본 Chameleon Co. 제를 사용하였다.

2. 토끼 신세뇨관세포의 분리 및 배양

체중 2 kg 내외의 New Zealand White rabbit의 신장에 7% arabic gum 및 HBSS에 부유된 ferrous oxide 과립¹⁸을 무균적으로 관류시킨 후 신피질 부위만 얻어, 세절 한후 digestion solution (HBSS, 100 u/ml collagenase, 1mg/ml dispase and 0.05% trypsin inhibitor)이 함유된 Tekmar sterile plastic bag에 옮겼다. 1~3분 가량 Tekmar stomacher로 약한 타격을 가한다음 spinner flask 로 옮겨 30분 가량 더 digestion 시켰다¹⁹. 세포 부유액에서 ferrous oxide과립을 함유한 사구체 들을 제거하기 위해서 반지모양의 자석으로 둘러싸인 column을 통과시켰다. 몇번의 원심분리를 통해 tubular fragment들을 세척한 다음 항생제와 우태아혈청이 보충된 배양액에 부유 시켜서 실험 용도에 따라 여러가지의 culture flask에 분주하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.

3. 세포생존을 측정

96 well microtiter plate에 키운 세포들이 full confluence에 도달 하였을때 $HgCl_2$ 를 투여한 뒤 각각의 시간에 $HgCl_2$ 를 함유한 배양액을 제거하고 50 ug/ml의 neutral red를 함유한 HBSS액 0.2 ml를 가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 여분의 neutral red dye를 제거한 후 4% formaldehyde-1% calcium mixture로 1분간 고정 후 1% acetic acid를 함유한 50% alcohol로 세포내에 흡수되어 있는 neutral red를 추출하여 540 nm filter로 장착된 Multiscan titertek (Flow

Lab. Inc.)으로 비색 정량하였다²⁰. 각 실험군은 16~24 well로 구성되었고 아무 처치도 하지 않은 대조군의 neutral red dye 흡수 정도에 대한 상대적인 비율로 표시 하였다.

4. HgCl₂ 처치후 유리 Ca²⁺ 양의 변화

Falcon flask(75 Cm²) 에서 full confluence에 도달한 세포들을 5 μM Fura2-AM으로 25℃에서 1시간 동안 부하한^{21,22} 다음 5 ml의 trypsin-EDTA(1 : 250)로 세포들을 모았다. 세포외액에 존재하는 여분의 Fura2-AM을 제거하기 위한 4번의 수세과정 중 trypsin inhibitor(3 mg/100 ml)와 DNAase(5 mg/100 ml)로 처치해 주고 세포 수를 2-4×10⁶ cells/ml 이 되게 조절 한 다음 4℃에서 보관하였다. 이중 200 ul를 취하여 1.8 ml의 HBSS로 채워진 cuvette에 옮겨준 후 이들을 magnetic microstirrer가 장착된 형광분광계(Hitachi F-4010)를 사용하여 340 ex/510 em 에서²³ 기초 값을 확인한 다음 HgCl₂를 각 농도별(2.5 - 100 μM)로 cuvette에 직접 투여하면서 시간 경과에 따른 [Ca²⁺]_i 변화들을 관찰하였다.

5. calcium pump(Ca²⁺-ATPase)의 효소조직화학적 염색

정상 또는 HgCl₂ 투여세포를 3% paraformaldehyde 에 1시간 고정을 한후 5 mM CaCl₂를 함유한 0.25 M glycine buffer(pH 9.0)에 60분간 반응시킨 다음 3 mM ATP, 10 mM CaCl₂, 4 mM CeCl₃, 0.1 mM ouabain(sodium pump억제), 8 mM levamisole(alkaline phosphatase억제)을 함유한 반응액에 1시간 반응시키면 조직에 있는 Ca²⁺-ATPase가 넣어준 ATP를 가수분해시켜 phosphate를 분리시키며 이를 capturing agent인 CeCl₃와 반응하여 생긴 침전물을 형태학적으로 확인 하였다²⁴.

6. ATP 측정

1×10⁵개/ml의 세포에 HgCl₂ 투여 후 각각의 시간에 ATP양의 변화를 luciferin과 luciferase를 함유한 Bioluminiscent Somatic Cell Assay Kit(Sigma제)를 사용하여 Luminometer(LKB, Bio-Orbit, Finland)로 측정 하였다.

성 적

1. cell viability

10 μM의 HgCl₂를 주었을때는 토끼 신세뇨관세포의 생존율에 전혀 영향을 미치지 않았다. 그러나 25

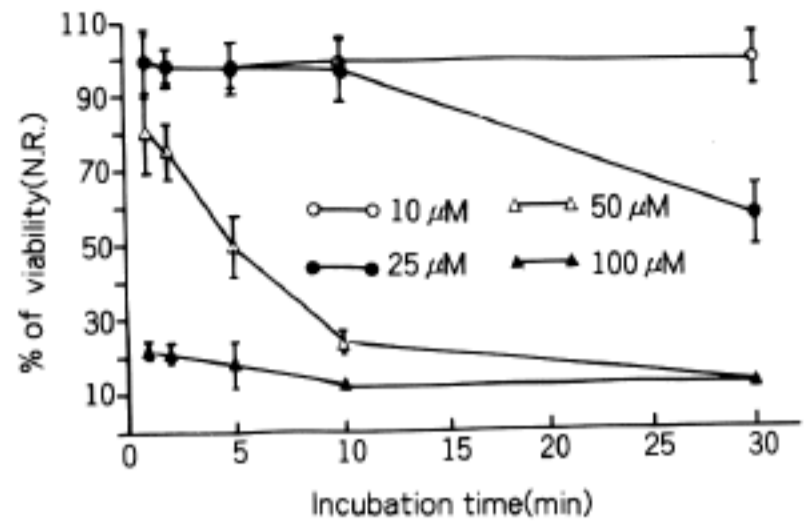


Fig. 1. HgCl₂ toxicity on cultured rabbit renal tubular cells determined by neutral red assay(NR). The results were the means ± SD of 4 experiments, and were expressed as percent of control value.

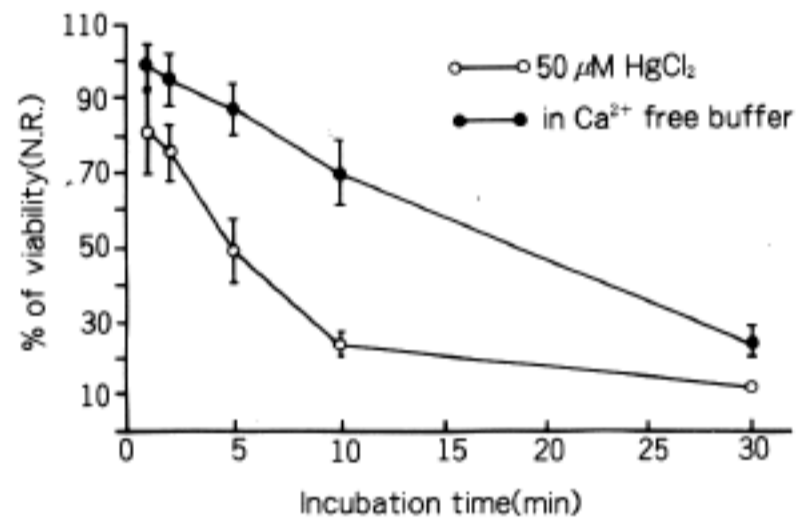


Fig. 2. Effect of absence of calcium in incubating media on cell viability of cultured rabbit renal tubular cells exposed to 50 μM HgCl₂. The results were the means ± SD of 4 experiments, and were expressed as percent of control value.

μM에서 10분까지는 세포생존을 감소가 없었으나 30분에 56.7±8.3%로 생존율이 감소하였고 50 μM과 100 μM의 HgCl₂ 농도에서는 1분에 80.9±11.2 및 22.0±2.3%로 이미 손상받기 시작하여 10분에 23.9% 및 12.2%로 대부분의 세포가 죽었다(Fig. 1). 그러나 1 mM의 EDTA로 세포외액에 있는 Ca²⁺을 완전히 제거하였을때는 세포손상을 완전히 보호해주지는 못하였지만 현저히 세포생존율을 향상시켰다(Fig. 2).

2. HgCl₂에 의한 토끼 신세뇨관세포의 세포질내 [Ca²⁺]_i의 변동

세포막을 주로 침범한다고 알려진 HgCl₂를 각 농

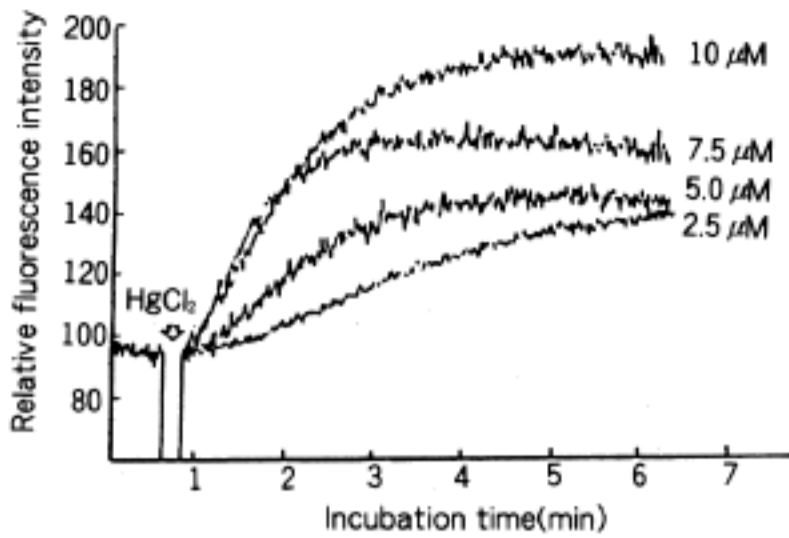


Fig. 3. Fluorescence measurements of Fura-2 loaded rabbit renal tubular cells(5×10^6 cells/ml) exposed to 2.5~10 μ M $HgCl_2$ in presence of 1.37 mM Ca^{2+} in HBSS.

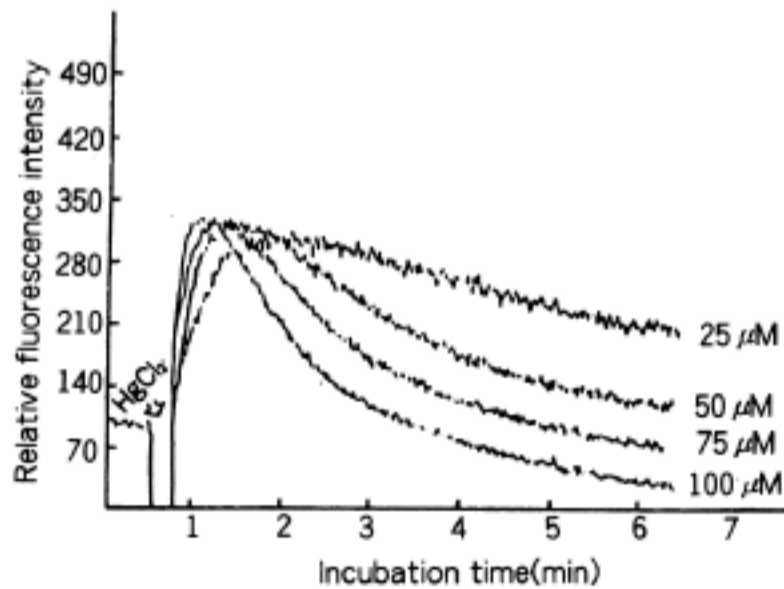


Fig. 4. Fluorescence measurements of Fura-2 loaded rabbit renal tubular cells(5×10^6 cells/ml) exposed to 25-100 μ M $HgCl_2$ in presence of 1.37 mM Ca^{2+} in HBSS.

도별로 토끼 신세뇨관세포에 준 후 세포질내 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변동을 알아 보았다. Fig. 3과 같이 $HgCl_2$ 의 농도가 10 μ M 이하로 투여한 경우에는 세포질내 $[Ca^{2+}]_i$ 의 농도가 서서히 증가하여 3분 내지 7분 사이에 plateau에 도달하는 쌍곡선 curve를 보였다. $HgCl_2$ 의 농도가 높을수록 plateau에 도달하는 시간이 짧았으며, $[Ca^{2+}]_i$ 의 양도 $HgCl_2$ 의 농도에 비례하여 높아져 계속적으로 높은 상태를 유지하고 있었다. 반면 $HgCl_2$ 의 농도가 25 μ M 에서 100 μ M사이인 경우에는 초기에 $[Ca^{2+}]_i$ 의 양이 급속도로 증가 하여 peak를 보였다가 서서히 감소하는 곡선을 보였으며 $HgCl_2$ 의 농도가 높을수록 최고점에 도달하는 시간이 짧아지는 경향을 보였다. 즉 100 μ M의 $HgCl_2$ 를 투여 하였

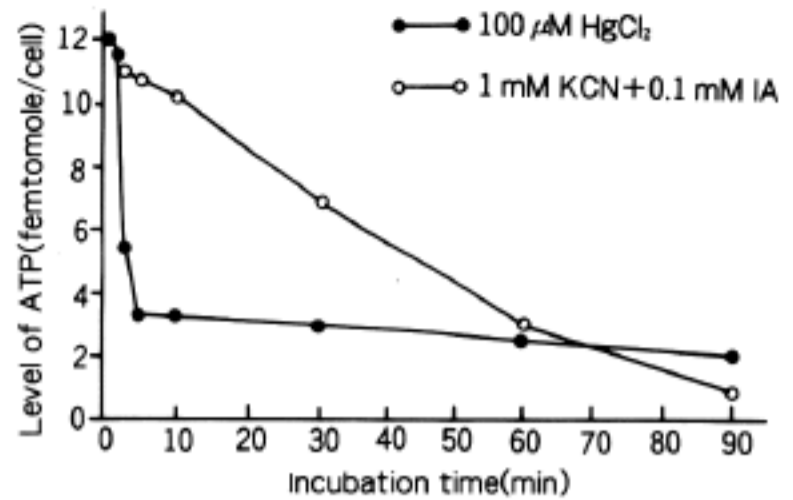


Fig. 5. The changes of ATP level of cultured rabbit renal tubular cells after treatment of chemical asphyxiant(KCN + iodoacetic acid) or $HgCl_2$.

을때는 23초에 극에 달하였으나 25 μ M인 경우에는 1분이 지나서 극에 달하였다. 그러나 최고점의 높이는 $HgCl_2$ 의 농도와 관계없이 모두 비슷하여 25 μ M 이상에서는 fura-2가 $[Ca^{2+}]_i$ 과 full saturation되었음을 알 수 있었다. 또한 10 μ M 이하의 농도에서와는 달리 25 μ M 이상의 $HgCl_2$ 농도 때는 시간이 경과 할수록 세포질내 $[Ca^{2+}]_i$ 의 양이 점차 감소하였는데 75 μ M, 100 μ M의 농도에서는 각각 4 분30 초 및 3 분 후에 정상 level에 도달 하였다가 시간이 경과할수록 더욱 감소하여 정상 level 이하로 떨어졌다. 그러나 25 μ M 및 50 μ M 농도에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 이 극에 도달한 후 떨어지는 속도가 서서히 진행하여 완만한 curve를 보였으며 오랜시간동안 방치하여도 정상 level 이하로는 떨어지지 않았다(Fig. 4).

3. ATP 양의 변동

토끼 신세뇨관세포의 정상 ATP의 양은 12 femtomole(1.2×10^{-14} M) 이었으나 100 μ M의 $HgCl_2$ 를 투여하였을때는 3분후 3.3 femtomole로 급격히 감소하였고 그 이후부터는 변화가 미미하여 90분에 2 femtomole로 떨어졌다. 이러한 양상은 chemical asphyxiant를 투여 하였을때와는 다른 모습을 보여 주었다. 즉 1 mM KCN 과 0.1 mM iodoacetic acid 를 동시에 투여하였을때는 시간이 경과 할수록 서서히 감소하여 90분 경에는 0.9 femtomole로 현저히 떨어져 있었다(Fig. 5).

4. Ca^{2+} -ATPase staining

광학 현미경상 토끼 신세뇨관세포의 Ca^{2+} -ATPase

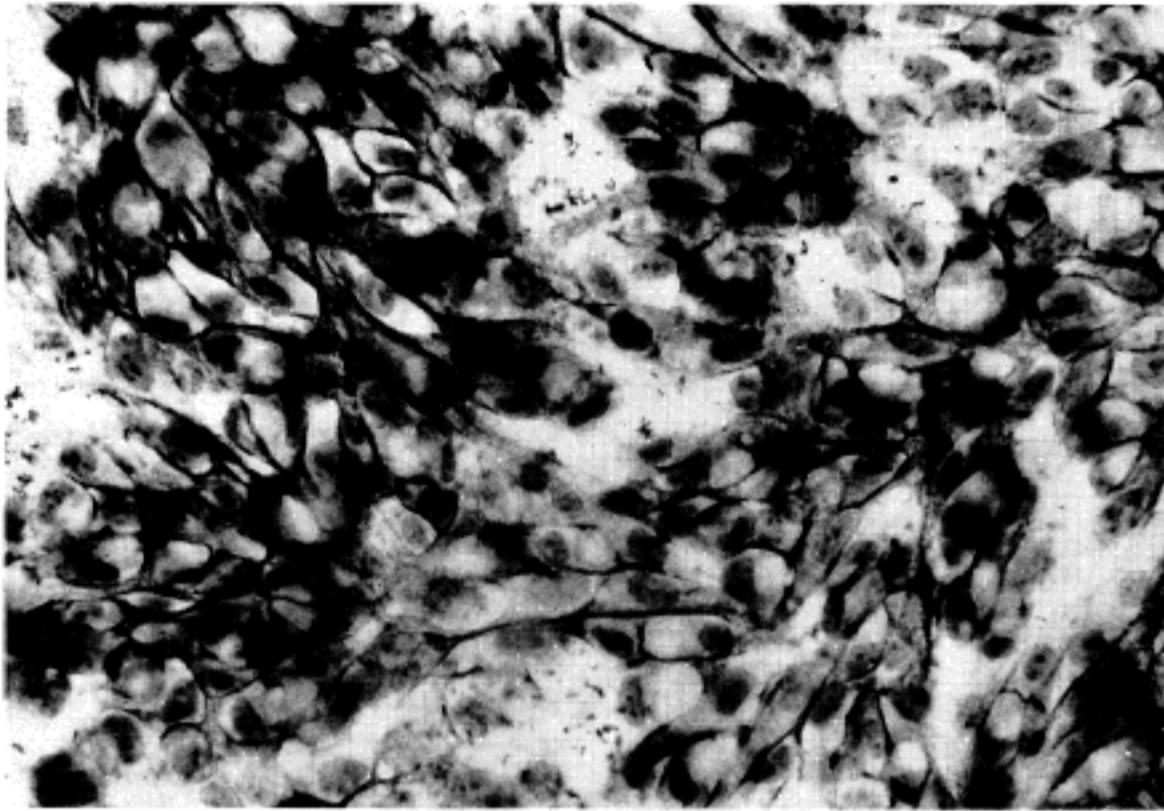


Fig. 6. Monolayer of rabbit renal tubular cells processed for Ca²⁺-ATPase localization by enzyme histochemical staining. Dark brown reaction products are present along the cell surface.

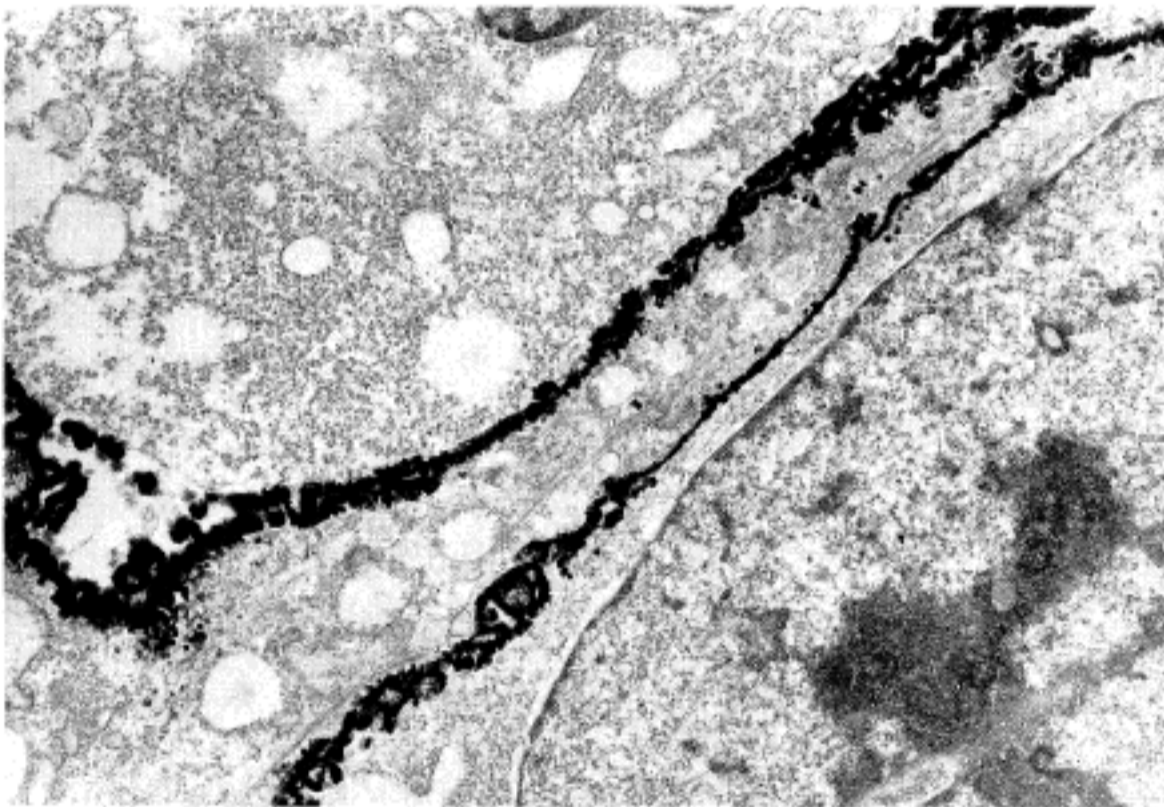


Fig. 7. Electronmicrograph of rabbit renal tubular cells processed for Ca²⁺-ATPase localization by enzyme histochemical staining. Electron dense reaction products are noted along the plasma membrane(×12,500).

는 세포막을 따라 암갈색의 선상으로 보였으며 특히 세포들이 서로 밀접하게 접촉하고 있는 곳에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 6). 전자현미경상으로도 이웃세포와 밀접하게 접촉하고 있는 곳에서만 세포막을 따라 크고 작은 과립들이 모여 굵은 선상으로 보였으나 세포사이에 간격이 있는 곳이나 free surface에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 7). 50 μM의 HgCl₂를 5분간 처리한 세포에서도 Ca²⁺-ATPase activity는 정상세포와 마찬가지로 소견을 보여 효소화학적 염색상 HgCl₂가 Ca²⁺-ATPase의 activity를 떨어뜨리지 않음을 알 수

있었다(Fig. 8).

고 찰

HgCl₂에 의한 세포손상시 [Ca²⁺]_i의 증가에 대해서는 많은 보고가 있으나 그 증가 양상이 보고자마다 달랐다. 옥과 이는¹⁶ MDCK(Mardin-Darby Canine Kidney)세포에서 똑같은 방법으로 [Ca²⁺]_i의 변화를 관찰하였으나 본 연구의 토끼 신세뇨관세포에서 HgCl₂에 대한 [Ca²⁺]_i의 변화와는 상이한 결과를 보여 주었다.

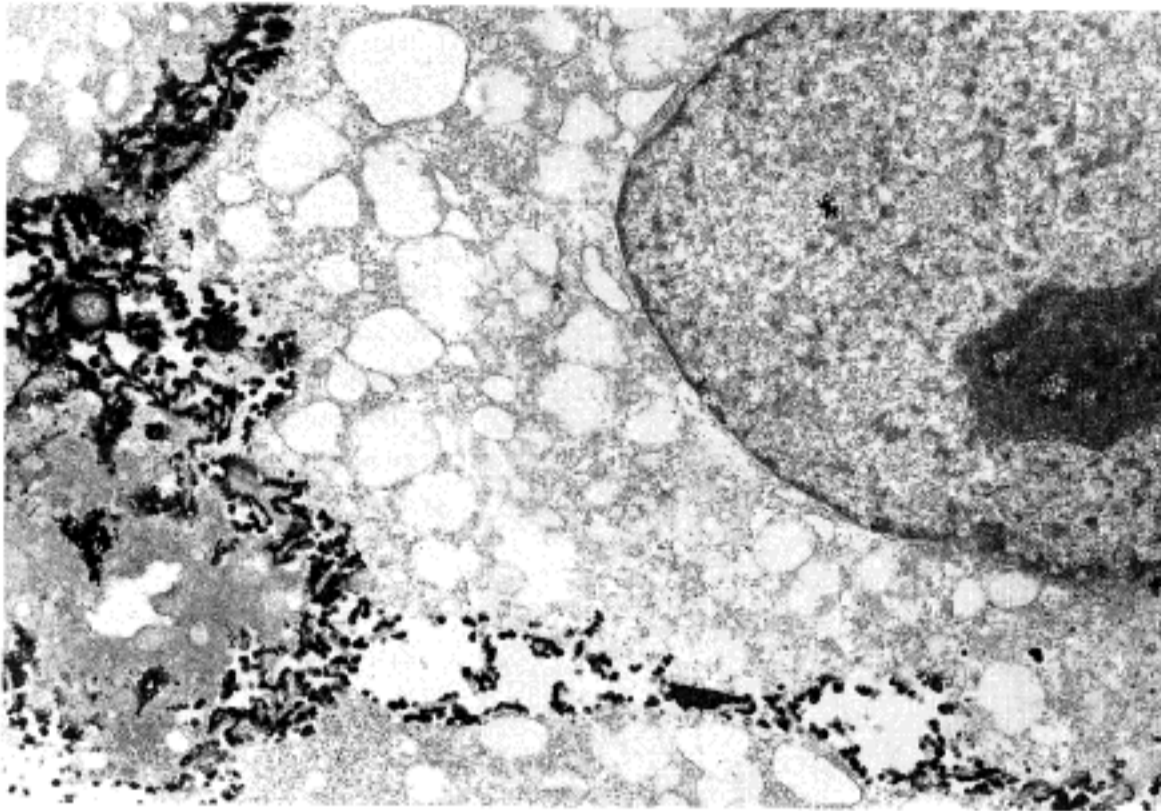


Fig. 8. Electronmicrograph of cultured rabbit renal tubular cells processed for Ca²⁺-ATPase localization by enzyme histochemical staining after treatment of 50 μ M HgCl₂ for 5 min. Electron dense reaction products are noted along the plasma membrane ($\times 10,000$).

즉 본 연구에서 관찰한 토끼 신세뇨관세포인 경우 10 μ M 이하의 HgCl₂ 농도에서는 초기부터 [Ca²⁺]_i 비교적 급히 증가하여 2~3분내에 최고점을 보인 후 서서히 평형을 이루는 쌍곡선 형태를 보여주었는데 (Fig. 3) 반하여 MDCK세포인 경우에는 HgCl₂투여 후 5~6분 경 부터 서서히 진행되는 느린 증가만 보여주었다. 또 25 μ M 이상의 농도에서 토끼 신세뇨관 세포는 HgCl₂투여 후 [Ca²⁺]_i 급격히 증가하여 1분 이내에 최고점에 도달한 뒤 다시 급격한 감소를 보였으며 특히 HgCl₂농도가 높을수록 [Ca²⁺]_i의 감소가 두드러져 100 μ M 농도에서는 오히려 정상보다 더 떨어짐을 보여 주었다(Fig. 4). 그러나 MDCK세포에서는 HgCl₂ 농도가 높아질수록 [Ca²⁺]_i의 초기 증가 속도가 빨라지며 최고점의 높이도 비례하여 높아짐과 동시에 계속적으로 높은 농도를 유지하였다. 이와같은 차이는 현재로서는 왜 생기는지 짐작하기가 어렵지만 흥미가 있는 것은 Smith등⁶이 토끼 신세뇨관 세포에서 관찰한 [Ca²⁺]_i의 변화가 본 연구와 아주 유사한 변화를 보였다는 점이며 이는 관찰하는 세포의 종류가 다르면 [Ca²⁺]_i의 증가형태가 다르게 나타날 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있으나 좀 더 다양한 세포들을 관찰해 볼 필요가 있다고 여겨진다.

HgCl₂를 포함한 많은 세포손상 model에서 [Ca²⁺]_i의 증가를 보여 주고 있지만 아직도 [Ca²⁺]_i의 증가가 비가역적 손상으로 이행하는데 중요한 역할을 하는 것인지 아니면 다른 손상에 따른 단순한 2차적인 변화인지에 대해서는 아직도 논란의 대상이 되고 있

다. Niminen등⁹은 HgCl₂에 의한 세포손상 표적은 사립체이며 [Ca²⁺]_i의 증가는 어디까지나 이차적인 변화라고 주장한다. 그 이유로 [Ca²⁺]_i의 증가가 ATP소실보다 뒤에 나타나기 때문이라 한다. 그러나 이러한 주장과는 달리 Smith등^{6,7}의 결과나 저자들이 관찰한 결과 모두에서 초기에 급격한 [Ca²⁺]_i의 증가를 보여 주었다. 한편 옥과 이¹⁶는 Ca²⁺ free buffer 에서 HgCl₂를 주었을때 [Ca²⁺]_i의 증가가 없음을 보고 HgCl₂에 의한 세포손상시 증가하는 Ca²⁺의 대부분이 세포바깥에서 동원되고 극히 일부는 소포체에 격리되어있는 Ca²⁺도 동원된다고 주장하고 있으나 Tang 등²⁵은 organic mercury인 경우에는 옥과 이¹⁶처럼 세포내의 소포체나 사립체에서도 유리되지만 HgCl₂인 경우에는 세포외액에 있는 Ca²⁺의 유입으로만 [Ca²⁺]_i의 증가가 일어난다고 주장하고 있다. 그러나 HgCl₂에 의한 [Ca²⁺]_i 증가의 대부분이 세포외액에서 동원된다는 것은 모두 일치되는 사실이어서 이를 근거로 1 mM의 EDTA로 세포외액의 Ca²⁺을 완전히 제거해 주었을때 세포생존율이 현저히 증가했다는 것은(Fig. 2) [Ca²⁺]_i의 증가가 세포손상에 아주 중요한 역할을 한다는 증거라고 할 수 있다. 본연구에서 10 μ M의 HgCl₂ 처치시 세포생존율에 전혀 변화가 없었는데 이때 [Ca²⁺]_i의 증가는 25 μ M 이상의 농도에서 보여 준 [Ca²⁺]_i의 양에 훨씬 못미치는 양이어서 비가역적 손상이 일어나는데 필요한 [Ca²⁺]_i의 양이 일정량 이상이어야 한다는 것을 암시하고 있으나 한가지 아쉬운점은 본연구에서 사용한 형광분광계는 이중흥분과장을 동시에 측정할수 없는 장비이어서 정확한

[Ca²⁺]_i의 양을 측정할 수 없어 비가역적 손상이 일어나는데 얼마 이상의 [Ca²⁺]_i이 필요하다는 것을 확인하지 못하였던 점이다.

세포외액에 Ca²⁺이 없을 때 세포생존율이 증가하기는 하였으나 완전히 보호하지 못하였고 시간이 지나면서 그 격차가 적어짐을 보여주었다. 이는 HgCl₂에 의한 세포손상이 [Ca²⁺]_i의 증가를 통한 손상 외에도 다른 경로를 통해서도 세포에 손상을 주는 것 같다. 이를 뒷받침 하는 것으로 HgCl₂의 농도가 높을수록 증가되었던 [Ca²⁺]_i이 오히려 정상보다도 더 낮아진다는 것은(Fig. 4) 세포를 구성하고 있는 여러 단백질들이 HgCl₂에 의해 변성되어서 Ca²⁺에 대한 친화력이 높아졌기 때문이라 여겨지며 또한 HgCl₂를 투여하면 세포내 ATP양이 현저히 감소하는 것(Fig. 5) 역시 HgCl₂에 의한 세포손상이 [Ca²⁺]_i의 증가만으로 설명하기는 어렵다고 여겨진다.

Chemical asphyxiant인 KCN과 anaerobic glycolysis를 억제하는 iodoacetic acid를 투여하였을 때 세포내 ATP양은 시간에 따라 서서히 감소하는 모습을 보이고 있으나 HgCl₂를 처치하였을 때는 ATP양이 초기에 급격히 떨어짐을 보여주고 있다 (Fig. 5). 이는 HgCl₂가 사립체를 억제하여 ATP생산을 감소시키기 보다는 ATP자체를 degradation 시키는 것 같은 느낌을 주고 있으나 좀더 연구해 보아야 하겠다.

위에서 언급한 것처럼 HgCl₂에 의한 [Ca²⁺]_i 증가의 대부분이 세포막을 통해서 일어난다는 것은 일치된 소견이라 할수 있지만 구체적으로 세포막의 어디를 어떻게 손상시키는지에 대해서는 아직 알려진 바 없다. 옥과 이는¹⁶ calcium channel blocker를 써 보아도 HgCl₂에 의한 [Ca²⁺]_i 증가에 아무런 영향을 미치지 않은 점으로 미루어 그 통로가 적어도 calcium channel이 아닌 세포막의 다른 부위라는 것을 암시하고 있다. 이에 저자들은 [Ca²⁺]_i 조절에 중요한 세포막의 Ca²⁺-ATPase를 의심해 보았다. HgCl₂는 thiol group에 매우 친화성이 높다. 따라서 -SH기를 가진 여러 단백질과 잘 결합을 한다. HgCl₂가 Na,K-ATPase를 억제하는 것으로 잘 알려져 있는데 이는 cardioactive steroid인 ouabain이 Na,K-ATPase에 있는 ouabain 수용체와 결합하여 pump cycle을 억제하는 것과는 달리 HgCl₂가 Na,K-ATPase의 -SH기와 결합함으로써 일어난다고 한다.^{26,27} Ca²⁺-ATPase도 -SH가 풍부한 효소로 알려져 있어 HgCl₂가 Na,K-ATPase를 억제한 것처럼 Ca²⁺-ATPase도 억제할 가능성이 있어서 효소조직학적 염색으로 이를 확인해 보고자 하였다.

생체실험에서 Ca²⁺-ATPase의 분포는 모두 기저측 부세포막에서만 발견된다고 하였다^{24,28}. 이는 본 연

구에서 관찰된 Ca²⁺-ATPase의 반응산물들이 세포들이 서로 밀접하게 접촉하고 있는 곳에서만 나타나는 소견과 무관하지가 않는 것 같다. 그러나 이러한 소견은 HgCl₂ 처치군에서도 대조군과 별다른 차이없이 관찰됨으로써 HgCl₂가 Ca²⁺-ATPase를 억제하지 않는 것 같았다. 한편 Stahl과 Baskin²⁹은 일반적으로 효소 세포화학법에 의한 Ca²⁺-ATPase 분포의 형태학적 소견을 Ca²⁺-ATPase의 기능으로 생각되고 있는 calcium pump와 관련시켜 설명하는 것은 무리라고 하였다. 그 이유로는, 세포에서 발견되는 Ca²⁺-ATPase의 일부만이 calcium pump의 기능을 하고 있고 현재 이용되고 있는 효소 화학법으로는 calcium pump 기능을 하는 Ca²⁺-ATPase만을 구분해 낼 수 없기 때문이다. HgCl₂를 주었을 때 Ca²⁺-ATPase 활성도에 변화가 없었던 이유가 이것인지에 대해서는 좀더 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

저자들은 HgCl₂에 의한 세포손상기전을 알아보기 위해 분리 배양한 토끼 신세뇨관세포에 HgCl₂를 처치한 후 세포생존율, 세포질내 유리 Ca²⁺의 변화, ATP양의 측정 및 Ca²⁺-ATPase 활성도의 변화유무를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) HgCl₂에 대한 토끼 신세뇨관세포의 생존율은 HgCl₂의 농도(10-100 μM)와 시간에 비례 하여 감소하였다.

2) 1 mM의 EDTA를 가하여 세포외액의 Ca²⁺을 제거해주면 HgCl₂에 의한 세포손상을 완전히 보호해 주지는 못하였지만 생존율을 현저히 증가시켰다.

3) HgCl₂ 처치에 따른 세포질내 유리 Ca²⁺의 변화는 HgCl₂의 농도(2.5~100 μM)에 따라 각기 다른 증가 양상을 보여주었다.

4) HgCl₂는 세포내 ATP양을 현저히 감소시키지만 KCN과 iodoacetic acid에 의한 ATP 감소와는 그 양상이 달랐다.

5) 효소면역학적 방법에 의한 Ca²⁺-ATPase activity는 HgCl₂에 의해 영향을 받지 않았다.

이상의 결과로 HgCl₂에 의한 세포손상시 세포질내 유리 Ca²⁺의 증가는 비가역적 세포 손상으로 이행하는 일련의 과정에 중요한 역할을 하리라 여겨지지만 HgCl₂가 세포에 직접적인 손상효과도 있을 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. Annu

- Rev Biochem 1987; 56: 395-433.
2. Chien KR, Sen A, Reynilds R, Chang A, Kim Y, Gunn MD, Buja LM, Willerson JT. Release of arachidonate from membrane phospholipids in cultured neonatal rat myocardial cells during adenosine triphosphate depletion. *J Clin Invest* 1985; 75: 1770-80.
 3. Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svenson SA, Bellemo G, Orrenius S. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through elevation of cytosolic Ca^{2+} and stimulation of nonlysosomal proteolytic system. *J Biol Chem* 1986; 261: 14628-35.
 4. Elliget KA, Phelps PC, Trump BF. $HgCl_2$ -induced alteration of actin filaments in cultured primary proximal tubule epithelial cells labelled with fluorescein phalloidin. *Cell Biol Toxicol* 1991; 7: 263-80.
 5. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th ed Saunder Co, Philadelphia 1994; 5-6.
 6. Smith MW, Ambudkar IS, Phelps PC, Regec AL, Trump BF. $HgCl_2$ -induced changes in cytosolic Ca^{2+} of cultured rabbit renal tubular cells. *Biochem Biophys Acta* 1987; 931: 130-42.
 7. Smith MW, Phelps PC, Trump BF. Cytosolic Ca^{2+} deregulation and blebbing after $HgCl_2$ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4926-30.
 8. Trump BF, Brezesky IK. The role of cytosolic Ca^{2+} in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Op Cell Biol* 1992; 4: 227-32.
 9. Nminen AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B. Toxic injury from mercury chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1990; 264: 2399-480.
 10. Jukowitz-Alexander MS, Altschuld RA, Hohl CM, Johnson JD, Mcdonald JS, Simmons TD, Horrocks L A. Cell swelling, blebbing, and death are dependent on ATP depletion and of calcium during chemical hypoxia in a glial cell line(ROC-1). *J Neurochem* 1992; 59, 344-52.
 11. Jacobs WR, Sgambati M, Comez G, Vilaro P, Higdon M, Bell PD, Mandel LJ. Role of cytosolic Ca in renal tubule damage induced by anoxia. *Am J Physiol* 1991; 260: C545-54.
 12. Barnes JL, Mcdowell EM, Mecneil JS, Flamenbaum W, Trump BF. Studies on the pathophysiology of acute renal failure. IV. Protective effect of dithiothreitol following administration of mercury chloride in the rat. *Virchows Arch B Cell Path* 1980a; 32: 210-32.
 13. Barnes JL, Mcdowell EM, Mecneil JS, Flamenbaum W, Trump BF. Studies on the pathophysiology of acute renal failure.V. Effect of chronic saline loading on the progression of proximal tubular cell injury and functional impairment following administration of mercury chloride in the rat. *Virchows Arch B Cell Path* 1980b; 32: 233-60.
 14. Rossi N, Ellis V, Kontry T, Gunther S, Churchill P, Bidani A. The role of adenosin in $HgCl_2$ -induced acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1990; 258 F 1554-60.
 15. Phelps PC, Smith MW, Trump BF. Cytosolic ionized calcium and bleb formation after acute cell injury of cultured rabbit renal tubule cells. *Lab Invest* 1990; 60: 630-42.
 16. 옥선명, 이정용. MDCK세포에서 $HgCl_2$ 처치에 따른 세포질내 유리 Ca^{2+} 양의 변동. 가톨릭대학교 의과대학 논문집 1994; 47: 87-96.
 17. Bindoli A, Fleisher S. Induced Ca^{2+} release in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by sulfhydryl reagent and chlorpromazine. *Arch Biochem Biophys* 1983; 221: 458-66.
 18. Cook WF, Picering GW. A rapid method for seperating glomeruli from rabbit kidney. *Nature* 1958; 182: 1103-4.
 19. 이명혜, 김주성. 배양한 쥐 신근위세뇨관 세포에서의 cisplatin 독성. 가톨릭대학교 의과대학 논문집 1994; 47: 697-710.
 20. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24: 119-24.
 21. Tsien RY, Rink TJ, Poenie M. Measurement of cytosolic Ca^{2+} in individual small cells using fluorescent microscopy with dual excitation wave lengths. *Cell Calcium* 1985; 6: 145-57.
 22. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440- 50.
 23. Prichard K, Ashley CC. Na^+ - Ca^{2+} exchange in isolated smooth muscle cells demonstrated by fluorescent calcium indicator fura2. *FEBS Lett* 1986; 195: 23-7.
 24. 유남진, 김주성. 쥐와 토끼의 신장 세뇨관에서 Ca-ATPase와 Na,K-ATPase의 분포. 가톨릭대학교 의과대학 논문집 1992; 45: 395-410.
 25. Tang XT, Castoldi AF, Manzo L, Costa LG. Effect of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J Toxicol Environ Health* 1993; 38: 159-70.

26. Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *Am J Physiol* 1992; 262: F830-6.
 27. Imesch E, Moosmayer M, Anner BM. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 1992; 262: F837-42.
 28. De Smedt H, Parys JB, Borghgraef R, Wuytack F. Phosphorylated intermediates of (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase and alkaline phosphatase in renal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1983; 728: 409-18.
 29. Stahl WL, Baskin DG. Histochemistry of ATPase. *J Histochem Cytochem* 1990; 35: 471-82.
-