

저산소증이 백서 근위 신세뇨관내 Phospholipase A₂ 활동도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실

최 규 현

급성 신세뇨관 괴사의 주된 병인론은 세뇨관 세포의 허혈성 손상의 결과라고 할수 있으며, 세포의 허혈성 손상은 세포내 저산소증을 일으켜 형태학적으로 세포내 organelle의 부종을 비롯하여 궁극적으로 세포 괴사를 초래하게 된다. 이러한 형태학적 손상이 유발되기전에 이미 세포내 생리학적 변화는 시작될 것으로 추정되어 왔으며 비가역적인 손상이 일어나기전의 변화를 규명하여 이를 정상화 시킴으로서 비가역적 손상으로의 진행을 방지하고자 세포의 허혈성 손상에대하여 많은 연구가 있어 왔다.

초기의 변화로서 보고자에 따라 다소 차이가 있으나 세포내 칼슘이 증가될 것으로 보고된바 있으며, 이에 따른 세포내 다양한 효소계의 변화가 초래될 것으로 추정되며, 결국 세포막 손상으로 인하여 투과도가 증가되고 세포 파괴가 일어나는 것으로 알려지고 있다. 신장세포 내에서 세포막 인지질의 파괴를 일으키는 주된 효소로서 phospholipase A₂ (PLA₂), C (PLC), D가 있으며, 사구체 메산지음 세포내 PLA₂는 호르몬 및 다양한 세포분열 자극물질에 의하여 활성화 됨이 알려져 있고, 1991년 Nakamura등¹⁾은 허혈성 손상을 유발한 쥐의 신장의 균등액으로부터 측정된 PLA₂의 활동도가 허혈시기 보다 재관류시기에 활성화 된다고 보고하였다. Matthys등²⁾은 허혈성 손상시에 세뇨관으로부터 자유 지방산의 유리가 증가됨을 보고하였으며 다량의 자유지방산의 투여가 세포막 손상을 일으킴을 관찰하였고, 역시 분리액내로 직접 투여한 PLA₂도 현저한 손상을 유발시킴이 알려져 PLA₂가 허혈성 손상을 일부 매개할 것으로 추정되어 왔으나 세뇨관 세포내 PLA₂ 자체의 활동도및 저산소증하에서의 변화에 대하여 확실히 밝혀져 있지 않다.

이에 세뇨관세포내 PLA₂의 저산소성 손상에 따른 변화, 특성 및 손상의 매개여부를 밝힘으로서 허혈성 손상을 방지하는데 도움을 얻고자 Gesek등³⁾의 방법을 참고

하여 백서로 부터 Percoll gradient를 이용하여 분리한 근위신세뇨관을 95%N₂/5%CO₂인 저산소증에 노출시켜 세뇨관내 PLA₂ 활동도를 측정하고 활성화 여부 및 그 기전, glycine 및 개발되어 있는 PLA₂ 억제제의 효과를 관찰 하였으며 세뇨관형 PLA₂의 특성을 밝히고자 연구를 진행하였다.

PLA₂ 활동도의 측정은 분리한 세뇨관을 분리액과 구분하여 각각 측정하였으며 세뇨관은 sonication 하여 균등액으로 추출한후 세포질과 membrane 분획으로 구분하여 Gronich등⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 [14C]-arachidonyl phosphatidyl ethanolamine (PE)과 choline (PC)을 substrate로 5 mM 칼슘 농도하에서 반응시킨후 thin layer chromatography로 분리하여 유리되는 arachidonic acid의 양을 pmol/min/mg of protein으로 계산하였고, PLA₂의 특성을 규명하기 위하여 FPLC superose 12 gel filtration column 으로 분획하였다.

실험 결과, 정상 세뇨관의 추출액내 PLA₂ 활동도는 세포질 분획에서 가장 높았으며 PC 보다 PE substrate에서 현저한 활동도를 보였으며 mitochondria 및 microsome 분획에서의 활동도는 상대적으로 세포질에 비하여 낮았으나 PC substrate에 대한 활동도는 세포질 보다 높았으며 모두 칼슘 의존성을 보였다. 따라서 세포내 분획에 따른 PLA₂의 특성이 다름을 의미하며 적어도 2 이상의 isoform이 존재할 것으로 생각된다. 30분간 저산소증에 노출시킨 세뇨관내 세포질분획의 PE substrate PLA₂ 활동도는 대조군에 비하여 현저히 상승하였으나, membrane 분획의 활동도와 PC substrate PLA₂ 활동도는 유의한 변화를 보이지 않았다. 반면에 30분간 저산소증에 노출시킨 세뇨관분리액 즉 세포외액에서 측정된 PLA₂ 활동도는 PE, PC substrate에 대한 활동도가 모두 유의있게 증가하였으며 칼슘의존도가 뚜

렸한 세포질내 PLA₂의 특성과는 달리 최고 5 mM EGTA 존재하에서도 활동도가 남아 있어 세포질내 PLA₂와 차이를 보였다. 이상의 결과로 보아 30분간 저산소증에 노출된 세뇨관내 PE substrate PLA₂가 활성화되는 것으로 생각되며, 이와함께 PE, PC substrate PLA₂ 모두 세포밖으로 방출되는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 바탕으로 저산소성 손상의 정도와 활성화 과정의 관계를 조사하기 위하여 저산소증에 노출되는 시간에 따른 변화를 실험한 결과 15분후 부터 세포질내 PE substrate PLA₂ 활성화를 관찰할 수 있었으며 세포 외액으로의 방출도 15분후부터 증가하여 30분후엔 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다. 특히 PLA₂의 세포외 방출은 저산소성 손상의 지표인 LDH 방출과 유사하게 노출시간에 비례하여 증가하였다. 생체의 저산소성 손상을 방지하는 것으로 알려진 대표적인 amino acid인 glycine의 PLA₂ 활성화 및 방출에 미치는 효과를 실험한 결과 glycine (2 mM) 전처리 30분후 측정된 세포질내 PLA₂ 활동도는 전처리 하지않은 경우와 유의있는 차이를 보이지 않았으나 세포외액으로의 방출은 현저히 방지됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 저산소증이 진행됨에 따라 15분후에 세포내 PLA₂는 이미 활성화 될 것으로 생각되며 세포외로의 방출이 시작될 것으로 판단되며, glycine에 의하여 세포내 PLA₂ 활성화는 억제되지 않으나 세포외로의 방출은 방지되는 것으로 사료된다.

세뇨관 PLA₂의 특성 및 활성화 기전을 규명하기 위하여 시도한 FPLC superose 12 gel filtration 실험에서 대조군에선 분자량이 각각 약 100 KD, 60 KD, 15 KD인 3peaks을 보인 반면 저산소증에선 15 KD의 단일 peak를 보이며 활동도의 현저한 상승을 보였다. 본 결과는 세뇨관내 적어도 분자량이 다른 두가지 이상의 PLA₂가 존재할 것으로 사료되며 특히 60 KD의 PLA₂는 메산지움 세포내 cPLA₂와 동일한 PLA₂ 일 것을 제시하며 저산소증에 노출될 경우 분자량이 큰 PLA₂의 파괴 또는 변화로 인하여 PLA₂ 활동도를 갖는 작은 분자량의 상태로 전환되거나, 소실되면서 작은 분자량의 PLA₂의 활성화에 의한 결과일 것으로 추측된다. 이와 병행하여 PLA₂의 특성을 보다 확실히 규명하고자 anion exchange column 및 cPLA₂ 항체를 이용한 immunoblotting을 시도하였으나 뚜렷한 결과를 얻을 수 없었다.

PLA₂의 억제를 통한 저산소성 손상의 방지 가능성을 알아보기위하여 세포질 및 세포외액의 PLA₂에 대하여

억제제로 개발되어 있는 mepacrine과 dibucaine에 대한 감수성을 비교하여 보았으나 세포외액내 PLA₂의 dibucaine에 대한 감수성만 50 μM에서 뚜렷하였으며, 세포질 PLA₂ 등은 억제 효과를 얻기 위하여 500 μM의 고농도가 요구 되어 기존의 PLA₂ 억제제에 대한 감수성은 뚜렷하지 않았다.

본 실험 결과 및 문헌⁵⁾을 참고하여 저산소증하에서 세포질내 PLA₂의 활성화 기전을 추정해보면 초기에 세포내 칼슘의 증가에 따른 부분적인 활성화를 예상할 수 있으며, 일반적으로 저산소증하에서 세포내 ATP의 저하는 효소의 탈인산화를 초래할 것으로 생각되어 인산화를 통한 활성화 보다는 칼슘 증가에 따른 세포내 proteolysis로 인하여 증가된 활동도를 가지며 분자량이 작은 상태로 전환된 결과일 것으로 생각된다.

결론적으로 세뇨관 세포내에는 세포내 분획 및 substrate 특이성에 따라 적어도 두가지 이상의 PLA₂ isoform이 존재하고, 저산소증에 의하여 활성화 되고 노출시간에 비례하여 세포외액으로 방출되는 것으로 판단되며, PLA₂의 세포내 활성화는 glycine에 의하여 억제되지 않으나, 세포외액으로의 방출은 억제될 것으로 사료된다. 따라서 저산소성 세포 손상에서 세포내 PLA₂의 활성화가 초래되어 손상에 기여할 뿐 아니라, 세포외액으로 방출되어 세포외부로 부터도 손상에 일부 기여할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Nakamura H, Nemenoff RA, Gronich JH, Bonventre JV: *Subcellular characteristics of phospholipase A₂ activity in the rat kidney. J Clin Invest 87:1810, 1991*
- 2) Matthys E, Patel Y, Kreisberg J, Stewart JH, Venkatachalam M: *Lipid alterations induced by renal ischemia: Pathogenic factor in membrane damage. Kidney Int 26:153, 1984*
- 3) Gesek FA, Wolff DW, Strandhoy JW: *Improved separation method for rat proximal and distal tubules. Am J Physiol 253:F358, 1987*
- 4) Gronich JH, Bonventre JV, Nemenoff RA: *Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. J Biol Chem 263:16645, 1988*
- 5) Bonventre JV: *Phospholipase A₂ and signal transduction. J Am Soc Nephrol 3:128, 1992*