

## 랫트의 신장 근위곡세뇨관 현탁액을 이용한 Cephloridine의 신장독성 평가

홍충만\* · 장동덕 · 신동환 · 최진영 · 조재천 · 이문한<sup>1</sup>

서울시 은평구 녹번동 5 국립보건안전연구원 병리부, <sup>1</sup>서울대학교 수의과대학

### Nephrotoxicity Assessment of Cephloridine using Rat Renal Proximal Tubule Suspension

Choong Man Hong\*, Dong Deuk Jang, Dong Hwan Shin, Jin Young Choi,  
Jae Chon Cho and Mun Han Lee<sup>1</sup>

Department of Pathology, National Institute of Safety Research,  
5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul 122-020, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

(Received March 28, 1995)

(Accepted April 20, 1995)

**ABSTRACT :** Rat renal proximal tubule suspension was prepared from adult male Sprague Dawley rat (250-300g) by mechanical (non-enzymatical) method and evaluated as a potential model for mechanistic studies and early screening of nephrotoxicity, using anionic antibiotics (cephloridine). Cephloridine (CPL) produced an increase in LDH release into media. This release results from decrease a proximal tubule cell viability and subsequently increase the permeability of cell viability and subsequently increase the permeability of cell membrane. Since loss of intracellular potassium and ATP into media is the sign of disruption of cell membrane, especially basolateral membrane (BLM), CPL induced proximal tubule cell compromise also appear be associated with BLM, maybe Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase. Also seen was significant depression in brush border membrane (BBM) ALP activity and no significantly increase in BBM GGT activities. The inhibition of typical anion, PAH accumulation (especially, CPL 5 mM) and cation, TEA (especially, 4hours incubation) were seen dose dependently. This is because of CPL accumulation in renal proximal tubule and increase of cytotoxicity.

**Key Words :** Para-aminohippuric acid, Nephrotoxicity, Tetraethylammonium bromide, Renal proximal tubule suspension, Cephloridine

### I. 서 론

신장의 근위곡세뇨관 분리기술은 Burg와 Orloff(1962)가 collagenase를 이용하여 신장의 피질부위에서 최초로 분리한 후, collagenase를 처리한 신장피질을 2단계의 sieving(210-64 μm)을 실시하여 순수한 분리기술이 더욱 발전하게 되었다(Scholer와 Edelmann, 1979; Vinay 등, 1981). 이렇게 분리한 근위곡세뇨관의 현탁액은 세포 호흡, 생체내 대사, 조직병리, 유기이온의 이동과정에서 화학물질이 어떤 영향을 주는지 연구하는데 적합한 기술이라고 하였다(Schnellmann과 Mandell, 1986). Hassal 등(1993)은 collagenase를 이용하지 않고 신장의 피질을 균질화한 후, 2단계의 sieving을 실시하여 근위곡세뇨관을

분리하는 기계적 방법을 이용하여 화학물질이 유기이온의 능동이동에 미치는 영향을 연구하였다. 근위곡세뇨관 현탁액을 이용한 신장독성의 평가는 화학물질의 표적세포가 근위곡세뇨관인 경우(Okumura 등, 1984)와 급성으로 작용하는 신장독성물질의 작용기전을 연구(Rylander 등, 1987)하는데 매우 유용한 실험모델이 될 수 있다고 제시하였다. 그러나 근위곡세뇨관을 분리하는데 collagenase를 이용하면 기계적인 방법보다 생존률도 연장할 수 있고 더욱 순수한 근위곡세뇨관을 분리할 수 있다는 장점이 있지만, 세포자체, 기저막 그리고 세포막이 손상을 받기때문에, 세포막에 존재하여 유기이온을 이동시키는 통로가되는 수송단백질에도 영향을 준다. 그래서 신장의 근위곡세뇨관 세포를 통한 유기이온의 이동과정을 연

구하는 경우에는 기저막을 잘 유지할 수 있는 기계적인 방법으로 분리하여 실험을 실시해야 한다. 이와 같이 실험목적에 맞게 근위곡세뇨관 분리방법을 선택하는 것이 매우 중요하다(Tyson과 Stacey, 1989).

신장독성 물질의 주요 작용부위는 근위곡세뇨관이고, 유기이온의 농도수송도 대부분 이 부위에서 일어난다. 따라서 본 실험에서는 기저막이 손상받지 않는 기계적인 방법으로 랫트의 근위곡세뇨관 분리기술을 확립하는데 그 첫번째 목적이 있고, 이것을 이용하여 음이온계 항생제로 신장독성이 있는 것으로 알려진 Cephalexin을 처치하여 대표적인 유기 양이온인 TEA(Tetraethylammonium bromide)와 음이온인 PAH(Para-aminohippuric acid)의 이동과 근위곡세뇨관의 BBM(Brush border membrane) 지표 효소등에 어떤 영향을 주는지 알아보려고 한다. 이와 같은 지표를 통해 Cephalexin 노출초기에 일어나는 미세한 변화등을 확인하여 신장독성 기전의 구명에 기초자료로 이용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 시험물질

실험동물은 국립보건안전연구원에서 사육하고 있는 SD(Sprague-Dawley) 수컷 랫트(250-300g)를 분양받아 고형사료(신촌사료) 및 물을 자유롭게 섭취시키면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 시험물질은 음이온계 항생물질로 신장독성이 이미 알려져 있으나 구체적인 독성기전은 불명확한 Cephalexin을 이용하였다.

### 2. 시험군의 설정

시험군은 4개의 군으로 정하였다. 무처리 대조군과 Cephalexin 처리군을 Group I(1 mM), Group II(3 mM) 그리고 Group III(5 mM)로 나누었으며, 이때 농도는 최종농도로 근위곡세뇨관을 분리 후 2 ml씩 분주한 시험관에 배양과 동시에 처리하였다.

### 3. 관류액과 배양액의 준비

관류액은 GLUCOSE 2.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.141 g, KCl 0.35 g, NaCl 6.6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g, CaCl<sub>2</sub>(2H<sub>2</sub>O) 0.373 g, CH<sub>3</sub>COONa 0.82 g에 증류수 1L를 부어 만들어 냉장보관 하였으며, 사용시에는 30분동안 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 혼합가스를 충분히 넣은 후 1N NaOH로 pH를 7.4로 맞추어 관류액을 사용하였다. 그리고 배양액은 관

류액 475 ml, Essential amino acid(50X) 10 ml, Nonessential amino acid(100X) 5 ml, Glutamate 5 ml, Bovine serum albumin 7.5 g을 섞어 500 ml의 배양액을 만든 후 0.45micron filter로 여과한 후, 사용시까지 냉장보관했으며 사용시에는 실온에서 fetal calf serum(heat inactivated)을 섞어 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 혼합가스를 15분간 충분히 넣은 후 1N NaOH로 pH 7.4로 맞추어 배양액으로 사용하였다.

### 4. 랫트의 신장 근위곡세뇨관의 분리방법

250-300 g의 수컷 S.D 랫트를 분리 하루 전에 절식시켜 pentobarbital sodium을 6.5 mg/100 g B.W 되게 복강내로 투여하여 마취시킨 후, 복부정중선을 절개하여 간문맥을 노출시켜 이곳에 18G catheter를 꽂고 작업 중 움직이지 않도록 결찰한다. 여기서 관류 완충액을 연결시켜 약 16 ml/min의 속도로 약 6분간 양측 신장을 관류를 시작하고 동시에 복대동맥을 절단하여 관류액이 배출되도록 하여 신장에 존재하는 혈액등을 제거한다. 이후 모든 작업은 얼음위에서 실시한다. 관류 종료후 양측 신장을 모두 떼어내어 capsule을 벗긴 후 신장의 피질만을 잘 떼어낸다. 이것을 잘 세절하여 피질무게의 10배 되는 부피의 관류완충액을 glass homogenizer에 넣어 균질화한 후, 210 μm의 nylon mesh로 거른다. 이 때 완충액 400 ml로 잘 씻어내면서 큰 세포 찌꺼기를 제거하고 다시 64 μm의 nylon mesh를 이용하여 완충액 300 ml로 잘 세척하면서 거른다. 그러면 64 μm의 mesh 위에 모아진 것들이 대부분 근위곡세뇨관이 된다. 이것을 미리 준비한 배양액에 현탁시켰으며 일부만을 trypan blue exclusion test를 실시하여 생존률을 검사한 후, 2 ml씩 실리콘 처리된 10 ml의 시험관에 분주하여 37°C, 95% air/5% CO<sub>2</sub> rotary incubator에서 실험에 맞게 30분, 1,2 그리고 4시간 동안 배양하였다.

### 5. 생화학적 검사

배양이 끝난 후, 2,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 상층액은 LDH를 측정하고, 남은 pellet은 1 ml의 TCA (6%)로 단백질을 침전시켜 다시 2,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액은 potassium과 ATP를 측정하였으며 pellet은 2N NaOH 1 ml로 단백질을 녹여 총단백질, ALP 및 GGT를 측정하였다. LDH, ALP, Total protein과 GGT는 자동생화학분석장치인 RA-XT(Technicon, USA)를 이용하여 측정하였고, ATP는 kit(SIGMA Diagnostics)를 이용하여 측정하였다.

6. 유기이온 이동실험

배양 완료 20분전에 대표적인 양이온인 <sup>3</sup>H-TEA (Tetraethylammonium bromide)과 음이온인 <sup>14</sup>C-PAH (Para-aminohippuric acid)를 배양시험관에 넣어 함께 배양하다가 배양이 끝난 후, 13,000 rpm으로 5분간 원심하여 상층액인 배양액과 3%의 Triton X-100으로 녹인 pellet(세뇨관)을 각각 scintillation cocktail에 섞어 β-counter로 양이온인 TEA와 음이온인 PAH의 양을 측정하여 세뇨관을 통한 이동 양상을 각각 관찰하였다.

7. 결과의 통계처리

모든 결과는 Dunnett's t-test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

Fig. 1은 Cephaloridine(CPL)의 처리가 랫트 근위곡세뇨관 세포내 LDH의 세포의 방출에 미치는 영향을 알아본 결과이다. CPL 5 mM 처리군에서는 모든 배양시간에서 1과 3 mM 처리군에서는 배양후 30분을 제외한 모든 시간에서 전형적인 용량의존성은 없었지만, 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 방출이 증가하였다. 즉 CPL에 의한 독성으로 생존물이 감소되면서 근위곡세뇨관 세포막의 투과성이 증가되어 세포안으로 밖으로 방출되는 것이다. Fig. 2는 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관 세포내 칼륨함량 미치는 영향을 알아본 결과이다. 배양 후 30분, 1 그리고 2시간까지는 대조군과 비슷하거나 약간 증가하였지만, 배양 2시간 이후에는 모든 처리군에서 감소하다가 특히 배양 후 4시간에는 대조군(345±34.21 nmole/

mg protein), 1 mM(293.5±25.7), 3 mM(291.7±24.37)과 5 mM(290.0±20.47)에서 감소하였다(p<0.05). 이것은 BLM(Basolateral membrane)의 integrity에 손상때문에 세포막의 에너지 상태가 변화하여 세포막간의 칼륨의 항상성에 영향을 준 것 같다. Fig. 3은 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관 세포내 ATP 함량에 미치는 영향을 알아본 결과이다. 각 처리농도에서 배양 후 30분(초기)과 4시간 사이의 변화를 각각 초기 백분율로 표시할때 CPL 1과 3 mM에서는 유의성 없이 대조군과 유사하게 증가하였지만, 5 mM(68.93±9.25%)에서 유의성(p<0.05)있게 감소하였다. 특히 고농도(5 mM) 처리시 감소한 것은 CPL이 세포막(BLM)에 영향을 주어 세포밖으로 ATP가 배출되기 때문이다. 이것은 Fig. 2의 결과인 칼륨의 감소와 관련하여 배양시간과 농도에서 정확하게 일치하지는 않았지만 역시 세포막 에너지 상태의 변화에 따른 결과인 것 같다. Fig. 4는 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관의 BBM (Brush border membrane) 지표효소인 GGT에 미치는 영

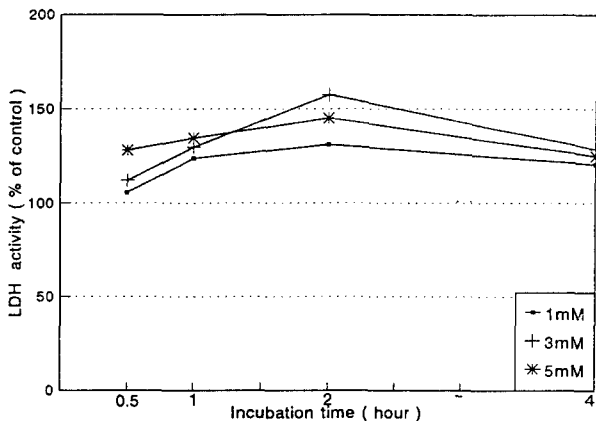


Fig. 1. Effect of cephaloridine on LDH release from rat proximal tubules.

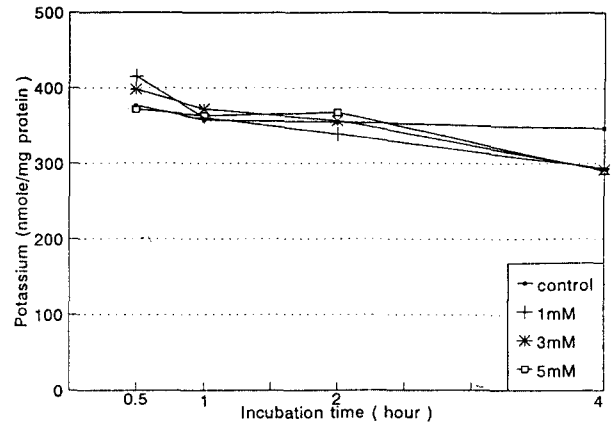


Fig. 2. Effect of cephaloridine on intracellular potassium content of rat proximal tubules.

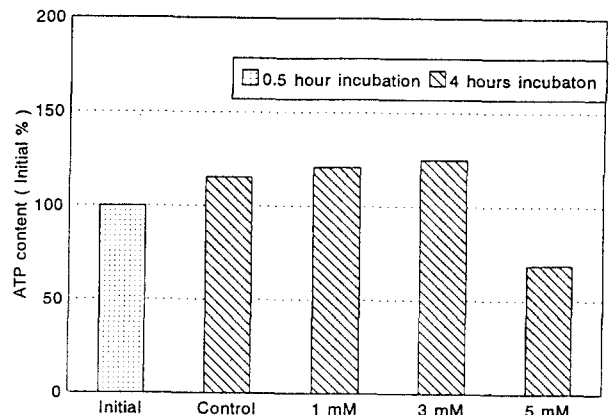


Fig. 3. Effect of cephaloridine on intracellular ATP content of rat proximal tubules.

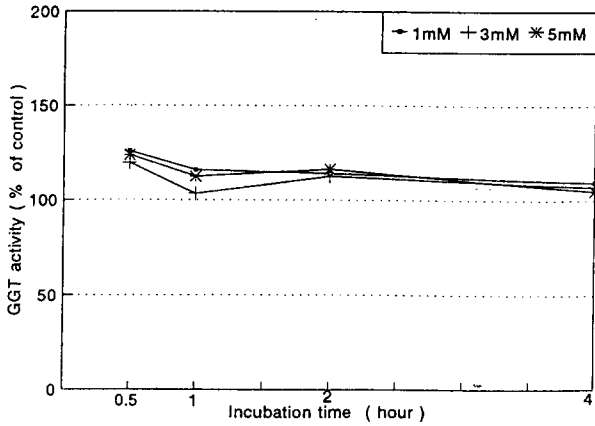


Fig. 4. Effect of cephaloridine on GGT activity of rat proximal tubules.

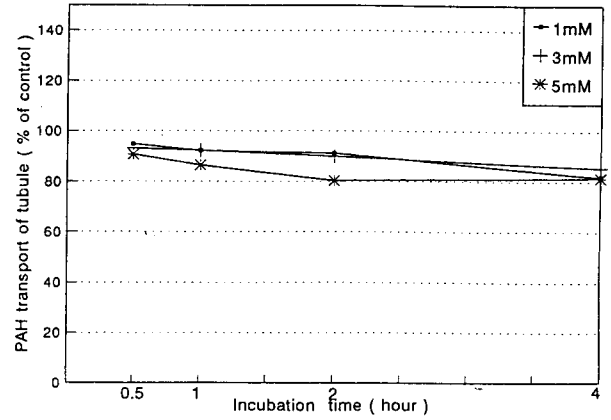


Fig. 6. Effect of cephaloridine on PAH accumulation by rat proximal tubules.

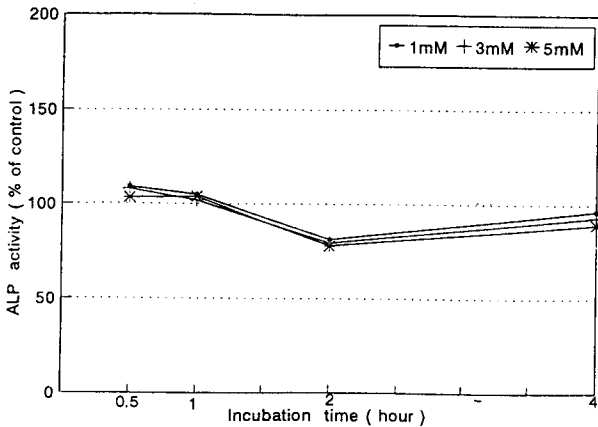


Fig. 5. Effect of cephaloridine on ALP activity of rat proximal tubules.

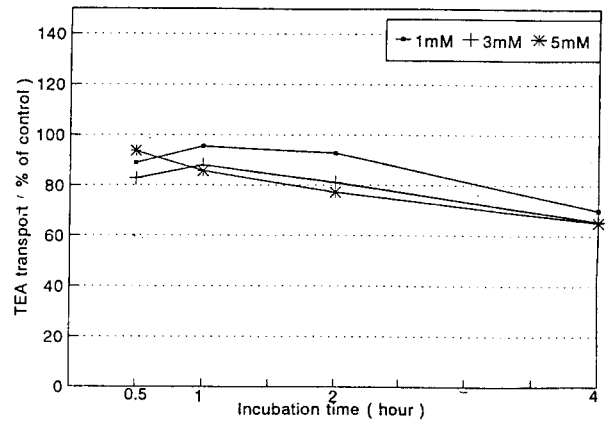


Fig. 7. Effect of cephaloridine on TEA accumulation by rat proximal tubules.

항을 알아본 결과이다. 대조군과 비교하여 GGT의 활성도가 모든처리 시간 및, 농도에서 약간 증가하는 경향이 있었지만 통계학적 유의성은 없었다. Fig. 5는 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관의 BBM 지표효소인 ALP에 미치는 영향을 알아본 결과이다. 모든 처리농도에서 배양 초기인 30분과 1시간까지는 대조군에 비해 증가하였지만 시간이 지남에 따라 특히 배양후 2시간에 1,3,5 mM에서 각각  $81.7 \pm 9.78$ ,  $79.4 \pm 7.50$ ,  $77.9 \pm 4.27\%$  로 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 감소하였고 4시간에서는 5 mM( $89.3 \pm 4.40$ )에서만 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였다. 이것으로 CPL이 농도와는 관계없이 배양시간이 경과함에 따라 BBM의 integrity에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. Fig. 6은 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관에서 전형적인 음이온인 para-aminohippuric acid(PAH)의 accumulation에 미치는 영향을 알아본 결과이다. 근위곡세뇨관 세포안에서 PAH의 accumulation이 모든 처리 시간에서 대조군에 비해 용량의존적으로 감소하였으며, 특히 5 mM의 경우에

는 30분( $87.76 \pm 8.34\%$ ), 1시간( $86.56 \pm 7.20\%$ ), 2시간( $80.28 \pm 4.28\%$ )과 4시간( $81.62 \pm 8.31\%$ )에 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다. Fig. 7은 CPL의 처리가 랫트 근위곡세뇨관에서 전형적인 양이온인 tetraethylammonium bromide (TEA)의 accumulation에 미치는 영향을 알아본 결과이다. 대조군과 비교해서 용량의존적으로 유의성( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )있게 감소하였으며, 특히 배양 후 4시간에서 1 mM( $69.95 \pm 4.3\%$ ), 3 mM( $65.6 \pm 9.48\%$ ), 5 mM( $65.14 \pm 3.25$ )에서 TEA accumulation이 더욱 감소하였다. 이것은 CPL이 세뇨관 세포내로의 축적이 증가되어 세포독성의 증가 혹은 전형적인 이온인 TEA와 PAH의 이동(transport)및 축적(accumulation)을 방해하기 때문이다.

#### IV. 고 찰

*In vitro* system을 이용한 실험방법은 *in vivo*와 모든 조건이 완전히 동일할 수 없지만 매우 유용하고 의미있는

대체 방법으로 알려져 왔다. 신장독성을 평가하기 위한 여러가지 *in vitro* 실험방법 중에서 근위곡세뇨관 현탁액을 이용한 평가법은 빠르고 효과적이며 특히 급성으로 작용하는 신장독성 물질에 적합하다(Rylander 등, 1987). 이 방법은 신장독성물질이 세포의 호흡(Aleo 등, 1991), 대사(Stroo와 Hook, 1983; Guder와 Wirthensohn, 1979), 이온이동(Okumura 등, 1984) 등에 미치는 영향을 평가하는데 널리 이용하고 있다. 그러나 근위곡세뇨관 분리방법(collagenase를 처리하여 분리하는 방법과 기계적으로만 분리하는 방법)은 신장 독성을 연구하는 목적에 따라 알맞게 선택해야 한다(Tyson과 Stacey, 1989).

*In vitro*와 *in vitro* 실험결과 Cephalosporin(CSP)계열의 항생제 중에서 Cephaloridine(CPL)이 가장 독성이 있으며 CPL은 다른 CSP계열과는 달리 신장의 근위곡세뇨관에서 매우 특이하게 독성을 유발한다고 하였다(Bradley 등, 1988/89). 본 실험에서는 신장에서 음이온의 형태를 띠며 신장독성이 있는 것으로 알려진 항생제인 CPL을 실험물질로 사용하였고, 양이온인 TEA(Tetraethylammonium bromide)와 음이온인 PAH(Para-aminohippuric acid)의 이동을 측정하기 위하여 랫트에서 근위곡세뇨관의 분리방법을 기계적인 방법만으로 분리하여 세포막 및 기저막의 손상을 최소화 하였다. Gandolfi와 Brendel(1990)이 지적한 것처럼 본 실험에서도 랫트의 신장 근위곡세뇨관을 기계적으로 분리한 결과 배양 중에 신장의 기능에 영향을 줄 수 있는 구(ball) 형태의 근위곡세뇨관을 형성하여 이런 문제점을 극복할 수 있는 방법이 요구되었다. 그럼에도 불구하고 기계적방법으로 분리한 시험법은 신장독성물질의 독성기전을 연구하는데 다양하게 이용되고 있다(Stroo와 Hook, 1983; Tyson 등, 1990; Winaver 등, 1990). 토끼의 근위곡세뇨관에 CPL을 1 mM 혹은 그 이하의 농도로 처리하면 PAH와 TEA의 uptake가 용량의 존적으로 약간 증가하며 그 이유는 이 농도에서는 CPL이 근위곡세뇨관 세포내에 축적(accumulation)하지 못하여 대신 이온들이 축적되기 때문이다(Rylander 등, 1985). 그래서 본 실험에서는 1 mM을 최저 농도로 정하고 CPL이 근위곡세뇨관 세포에 축적하여 세포에 손상을 줄 수 있도록 3 mM과 5 mM 농도로 각각 처리하였다. 실험결과 ALP(Alkaline phosphatase)의 활성도가 대조군에 비하여 배양 4시간보다 오히려 2시간에서 감소한 것처럼 시간의존적이지 못한 여러 결과로 보아 CPL 처리 후 배양시간은 어느 정도 CPL의 신장독성을 보는데 의미가 작았다. Tyson 등 (1990)은 랫트의 근위곡세뇨관을 이용하여 CPL의 신장 독성을 실험한 결과 LDH(Lactic dehydrogenase) 방출과 산소소모량이 배양시간과 처리농도와 비례하여 증가하였지만, 산소 소모량과 GGT( $\gamma$ -glu-

tamic transpeptidase)의 활성도에 미치는 영향이 없이 독립적으로 ALP가 감소한다고 하였고 이것은 세뇨관의 단백질 함량과 관련성이 없었는데, 본 실험에서 ALP가 배양 2시간에 급격하게 감소하였고 GGT는 유의성이 없이 대조군에 비해 약간 증가하였다. 이처럼 CPL이 신장근위곡세뇨관의 BBM(Brush border membrane) 지표효소인 ALP와 GGT에 미치는 유사한 영향을 확인할 수 있었다. Rylander 등(1987)은 근위곡세뇨관 세포내 칼륨과 ATP를 유지하는 것으로 보아 근위곡세뇨관의 생존률의 평가지표로 이용하여 정상적으로 배양시간이 지남에 따라 이들 지표가 약간 증가한다고 하였다. 본 실험에서는도 CPL처리시 ATP는 5 mM을 처리하였을 경우에만 유의성있게 감소하였고 칼륨은 배양 2시간 이후에 모든 처리군에서 감소하였다. 이런 실험결과는 CPL이 BLM(Basolateral membrane)에 존재하면서 ATP와 칼륨의 항상성을 유지하는  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase에 영향을 주어 이것이 세포막의 integrity에 영향을 주어 세포막의 에너지 상태를 변화시킨것 같다. 정상적으로 이 효소는 세포막을 통한 나트륨과 칼륨의 평형에 작용을 하고 신장 근위곡세뇨관 세포들은 산소를 소비하면서 ATP를 만든다. 이런 평형이 깨지면 세포내 ATP에는 큰 변화가 없는데, 세포내 칼륨이 급격히 감소하며 이어서 세포막의 나트륨 gradient가 없어서 본 실험 결과처럼 음이온인 PAH가 근위곡세뇨관내 축적이 차단되어 감소한 것 같다. TEA uptake는 세포막과 비교하여 세포막안에서 정상적으로 형성되는 음전하때문에 발생하는 carrier mediated process이다(Takano 등, 1984). 본 실험에서의 양이온인 TEA의 축적이 감소되는 것은 세포내 칼륨이 밖으로 방출되면서 세포막간 탈분극이 발생하여 TEA의 uptake가 억제되기 때문인 것 같다. 본 실험결과에서는 세포막의 손상이 CPL에 의한 신장독성의 첫번째 원인이 되어 LDH가 배양초기부터 증가하였고, CPL 5 mM에서 ATP가 배양초기와 비교하여 감소한 것은 이 농도에서 특히 세포막의 손상이 심하여 세포밖으로 많이 방출되었기 때문인것 같다. 이런 실험결과는 신장의 근위곡세뇨관의 초기배양에서 CPL이 여러 지표중에서  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase의 활성도에 가장 민감한 변화를 유발(Smith 등, 1987)한다는 결과로 설명할 수 있을 것 같다. 그리고 세뇨관 세포내 칼륨이 배양 2시간과 4시간의 모든 농도에서 감소하는 것은 LDH 방출의 증가와 이온의 축적억제와 같은 점진적인 세뇨관 손상의 표시이다.

이런 실험결과를 통해 근위곡세뇨관을 이용한 신장독성 평가방법은 화학물질에 의한 근위곡세뇨관 손상결과에 초점을 맞춘 간단한 방법으로 화학물질에 의한 신장독성의 원인을 이해하는데 도움이 될 것이다.

## 참고문헌

- Aleo, M.D., Wyatt, R.D. and Schnellmann, R.G.(1991): The role of altered mitochondria function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **109**, 455-463.
- Bradley, M.O., Noble, C. and Sina, J.F. (1988/89): An *in vitro* nephrotoxicity assay useful in drug development, *In vitro Toxic.*, **2**(3), 171-182.
- Burg, M.B. and Orloff, J. (1962): Oxygen consumption and active transport in separated renal tubules, *Am. J. Physiol.*, **237**, F350-359.
- Gandolfi, A.J. and Brendel, K.(1990): *In vitro* systems for nephrotoxicity studies, *Toxic. in Vitro*, **4**(4/5), 337-345.
- Guder, W.G. and Wirthensohn, G.(1979): Metabolism of isolated kidney tubules, *Eur. J. Biochem.*, **99**, 577-584.
- Hassal, C.D., Gandolfi, A.J. and Brendel, K.(1983): Correlation of the *in vivo* and *in vitro* renal toxicity of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine, *Drug Chem. Tox.*, **6**, 507-520.
- Okumura, K., Yamakita, H., Kaymiya, A. and Hori, R. (1984): Effects of nephrotoxic compounds on active uptake of drugs in isolated renal tubules in rabbit, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2055-2059.
- Rylander, L.A., Gandolfi, A.J. and Brendel, K. (1985): *Alternative methods in Toxicology*. (Mary Ann Liebert, Inc., New York), P. 235-247.
- Rylander, L.A., Phelps, J.S., Gandolfi, A.J. and Brendel, K. (1987): *In vitro* nephrotoxicity of cadmium chloride and dichlorovinyl cysteine to isolated renal tubules, *In vitro Toxic.*, **1**, 111-127.
- Schnellmann, R.G. and Mandel, L.J. (1986): Multiple effects of presumed glutathione depletor of rabbit proximal tubules, *Kidney Int.*, **29**, 858-862.
- Scholer, D.W. and Edelman, J.S. (1979): Isolation of rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments, *Am. J. Physiol.*, **237**, F350-359.
- Smith, M.A., Acosta, D. and Bruckner, J.V. (1987): Cephaloridine toxicity in primary cultures of rat renal cortical epithelial cells, *Toxic. in vitro*, **1**, 23-29.
- Stroo, W.E. and Hook, J.B. (1983): Dissociation of renal organic anion transport from renal lipid mechanism. I. Endogeneous nonesterified fatty acids(NEFA) as determinants of transport, *J. of Pharmacol. Exp. Therap.*, **227**(1), 55-59.
- Takano, M., Inui, K. I., Okano, T., Saito, H. and Hori, R. (1984): Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush-border and basolateral membrane vesicles, *Biochem. Biophys. Acta.*, **773**, 113-124.
- Tyson, C.A., Dabbs, J.E., Cohen, P.M., Green, C.E. and Melnick, R.L. (1990): Study of nephrotoxic agents in an improved renal proximal tubule system, *Toxic. in Vitro*, **4**(4/5), 403-408.
- Tyson, C.A. and Stacey, N.H. (1989): *In vitro* screens from CNS, liver and kidney for systemic toxicity, *Toxic Ind. Hlth.*, **5**, 107-132.
- Vinay, P., Gougoux, A. and Lemieux, G. (1981): Isolation of pure suspension of rat proximal tubules, *Am. J. Physiol.*, **241**, F403-411.
- Winaver, J., Burnett, J.C., Tyce, G.M. and Dousa, T.P. (1990): ANP inhibits Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport in proximal tubular brush border membrane: Role of Dopamine, *Kidney Int.*, **38**, 1133-1140.