

## Effect of Amino Acids on Anoxia-induced Cell Injury

Soon-Hee Jung

Department of Chinju Health College

This study was undertaken to examine the effect of amino acids on anoxia-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. In order to induce anoxic cell injury, slices were exposed to a 100% N<sub>2</sub> atmosphere and control slices were exposed to 100% O<sub>2</sub>. Irreversible cell injury was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release and alterations in renal cell function were examined by measuring p-aminohippurate (PAH) uptake. Anoxia caused the increase in LDH release in a time-dependent manner. Glycine and glutathione almost completely prevented anoxia-induced LDH release. Of amino acids tested, glycine and alanine exerted the protective effect against anoxia-induced cell injury. However, asparagine with amide side chain, leucine and valine with hydrocarbon side chain, and basic amino acids (lysine, histidine, and arginine) were not effective. Anoxia-induced inhibition of PAH uptake was prevented by glycine. ATP content was decreased by anoxia, which was not affected by glycine. Anoxia-induced depletion of glutathione was significantly prevented by glycine. These results suggest that neutral amino acids with simple structure exert the protective effect against anoxia-induced cell injury the involvement of specific interaction of amino acids and cell structure.

**Key Words:** Anoxia, Amino acids, Renal cortical slices, LDH release, Rabbit

### 서 론

허혈성 급성신부전은 신동맥을 결찰하고 시행해야만 하는 수술이나 신장이식시에 자주 발생하는 신장질환으로 발병율이 높고, 또한 발병하게 되면 치료가 어렵고 치사율이 높기 때문에 병태생리학적인 기전과 치료 및 예방 대책에 대한 연구들이<sup>1-10)</sup> 광범위하게 행해져 왔으나 아직도 만족할만한 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다<sup>3)</sup>. 허혈에 의한 세포손상이 대사억제로 인한 세포내 ATP의 고갈이 중요하게 작용하는 것으로 Weinberg에<sup>8,9)</sup> 의해 연구되어 왔다.

시험관내 실험을 통해 허혈에 의한 세포손상을 연구할 때는 조직을 무산소 상태에 일정시간 동안 노출시켜 세포손상을 유발시키는 방법을 많이 사용하고 있는 데, 신장의 근위세뇨관을 무산소에 노출시키게 되면 생체에서와 같이 세포내 ATP가 급히 감소하게 되고, 세포손상이 나타나게 되는 것으로 Weinberg에<sup>8,9)</sup> 의해 밝혀졌다. 따라서 무산소에 의한 세포손상을 방지할 수 있는 대책을 밝혀낸다면 허혈성 급성신부전을 예방하거나 방지할 수 있는 방법이 수립될 수 있을 것이다. 무산소에 의한 세포손상이 아미노산인 glycine에 의해 방지된다는 연구 결과들이 분리된 신장근위세뇨관과 세뇨관세포를 이용한

실험에서 Weinberg에<sup>9)</sup> 의해 보고되었다. 그러나 glycine이 어떤 기전으로 방지효과를 나타내는지에 대해서는 알려진 바 없어, 본 연구에서는 신장피질절편을 이용하여 무산소에 의한 세포손상에 대한 여러 가지 아미노산들의 효과를 조사하여 여러 연구자들과<sup>4-7,9)</sup> 일치하는지 확인하고, 또한 glycine이 어떤 기전으로 무산소에 의한 세포손상 방지효과를 나타내는지 알아 보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 신피질절편의 제작

체중 1.5~2.0 kg되는 토끼를 희생시킨 후 신장을 들어 내어 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl (pH, 7.5)로 된 냉한 용액을 신동맥내에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3~0.5 mm 두께의 신피질절편을 만들어 사용하였다.

#### 2. 무산소에 의한 세포유도

신피질절편에서 무산소에 의한 세포손상을 유발시키기 위하여 신장피질절편을 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl (pH, 7.5) 및 5 mM glucose로 된 용액 내에서 100% 질소 (N<sub>2</sub>) 공급하에 적당한 시간 동안 incubation하였고, 정상대조군은 100% 질소 대신 100% 산소를 공급하였다.

\*논문 접수: 2001년 9월 3일  
수정재접수: 2001년 9월 25일

†별책 요청 저자: 정순희

### 3. 세포손상 측정

신장피질절편에서 세포손상 정도를 확인하기 위하여는 lactate dehydrogenase (LDH) 유리를 측정하여 판정하였는데, 적당한 조건에서 incubation한 신장피질절편을 처리용액으로부터 분리한 후 조직을 마쇄하여 incubation 용액과 마쇄된 조직액 각각 50  $\mu$ l를 취하여 LDH 활성을 LDH assay kit (Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였다.

### 4. 신피질절편에서 p-aminohippurate (PAH) 이동 실험

토끼를 희생시킨 후 신장을 들어 내어 위에서 설명한 대로 신피질절편을 만들어 PAH의 이동을 측정하였다. PAH 이동은 74  $\mu$ M의  $^{14}$ C-PAH가 들어 있는 Cross-Taggart 용액내 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4)에서 신피질절편을 60분 동안 incubation한 후 일반적인 방법으로 피질내 축적된  $^{14}$ C-PAH의 양을 scintillation counter로 측정하여 조직내 축적된 양을 S/M 비로 나타내었다.

### 5. Glutathione (GSH) 함량 측정

GSH 함량은 Anderson의 방법으로 측정하였다. 0.248 mg/ml NADPH (in stock buffer: 143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na<sub>4</sub>-EDTA, pH 7.5) 용액 700  $\mu$ l, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 용액 100  $\mu$ l와 증류수 198  $\mu$ l를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데웠다. 시료 2  $\mu$ l를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase 10  $\mu$ l를 첨가하여 412 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였다.

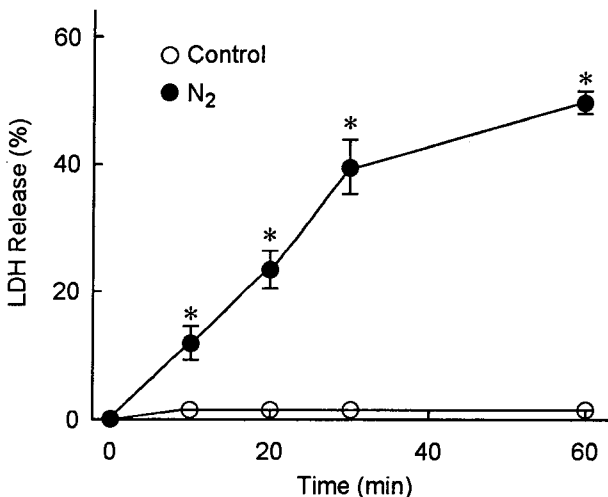


Fig. 1. Time course of anoxia-induced lactate dehydrogenase (LDH) release in rabbit renal cortical slices. Slices were exposed to 100% N<sub>2</sub> or 100% O<sub>2</sub> (control) for various time points. Data are mean  $\pm$  SE of four experiments. \**P*<0.05 compared with control.

### 6. 세포내 ATP 함량 측정

조직세포내 ATP 함량은 Sigma사의 ATP 측정 시약 (Luciferase-Luciferin, Sigma)을 이용하여 측정하였다.

### 7. 자료정리 및 통계처리

성적은 평균치 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 평균치 간의 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였고 *P* 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

신피질절편을 무산소처리에 의해 나타나는 세포손상을 처리 시간별로 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 신피질절편을 100% 질소에 10-60분 동안 노출시켰을 때 세포손상의 지표인 LDH 유출이 10분에서부터 증가하여 60분까지 시간 의존적으로 증가하였다. 그러나 100% 산소하에 60분 동안 노출시켰을 때는 유의한 변화를 보이지 않았다. 이후 실험에서는 신피질절편을 100% 질소환경하에 30분 동안 노출시켜 무산소에 의한 세포손상을 유도하였다.

무산소에 의한 세포손상에 glycine과 glutathione에 의해 방지되는 지를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 신피질절편을 100% 질소환경하에 30분 동안 노출시켰을 때 LDH 유출이 정상대조군의 2.04 $\pm$ 0.50%에서 21.82 $\pm$ 4.29%로 약 10배 이상 증가하였다. 그러나 무산소를 처리하는 용액내 5 mM gly-

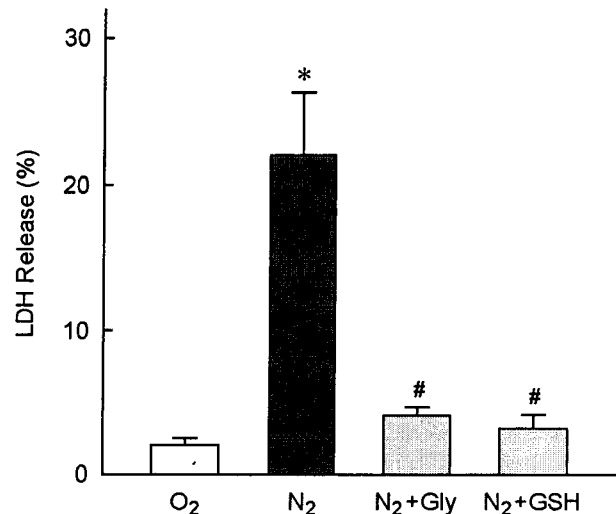


Fig. 2. Effects of glycine and glutathione (GSH) on anoxia-induced lactate dehydrogenase (LDH) release in rabbit renal cortical slices. Slices were exposed to 100% N<sub>2</sub> or 100% O<sub>2</sub> (control) for 30 min in the presence or absence of 5 mM glycine. Data are mean  $\pm$  SE of four experiments. \**P*<0.05 compared with control, #*P*<0.05 compared with N<sub>2</sub> alone.

cine을 첨가하였을 때  $3.99 \pm 0.58\%$ 로 거의 정상 수준까지 감소하였고, 5 mM glutathione (GSH)을 첨가하였을 때도 유사한 방지효과가 나타났다.

Table 1은 여러 가지 아미노산들의 방지효과를 조사한 결과이다. 시험된 아미노산들 중에서 중성 아미노산들인 glycine과 alanine이 월등한 방지효과를 보였고, 중성 아미노산인 asparagine과 leucine은 통계학적인 유의성은 인정되지 않았으나

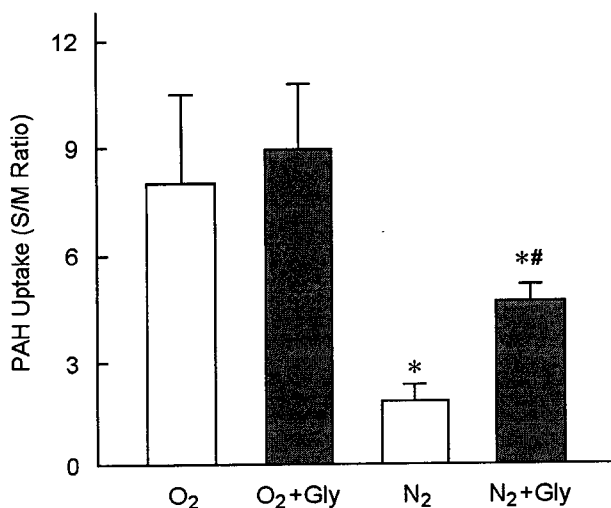
**Table 1.** Effects of amino acids on anoxia-induced lactate dehydrogenase (LDH) release in renal cortical slices

Conditions	Amino acids	LDH release (%)
Control (O <sub>2</sub> )	No addition	1.87±0.40
	Glycine	1.87±0.40
Anoxia (N <sub>2</sub> )	No addition	19.53±2.94
	Glycine	4.09±0.63*
	Alanine	4.48±1.43*
	Asparagine	11.89±1.05
	Leucine	14.04±1.00
	Valine	17.62±1.65
	Lysine	21.73±5.92
	Histidine	20.81±2.18
	Arginine	20.63±4.15

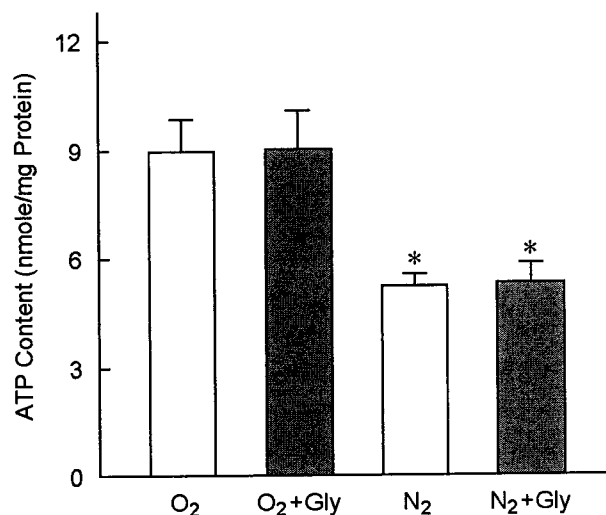
Slices were incubated for 30 min under a 100% O<sub>2</sub> or 100% N<sub>2</sub> atmosphere in the presence or absence of each 5 mM of amino acids. Data are mean ± SE of four experiments. \*P<0.05 compared with anoxia in medium without any amino acid (No addition)

무산소처리에 의해 증가된 LDH 유출을 감소시키는 경향을 보였다. 그러나 중성 아미노산인 valine, 염기성 아미노산인 lysine, histidine과 arginine은 영향을 미치지 못하였다.

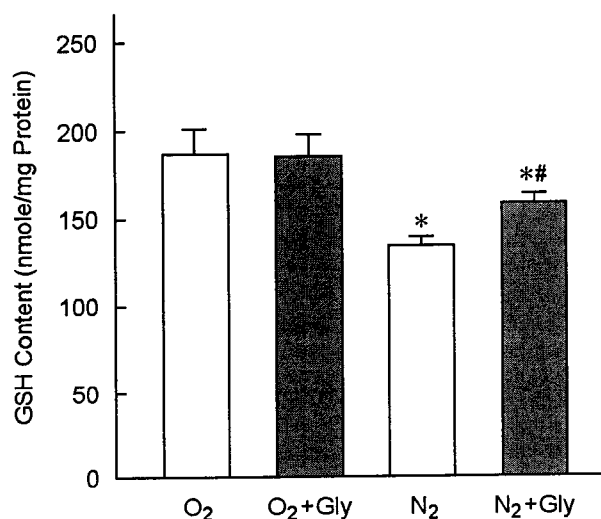
LDH 유출에 대한 아미노산의 방지효과가 세포막 물질이동계의 장애에서도 나타나는지를 확인하기 위하여 심피질절편에서 능동적으로 이동하는 PAH 축적에 대한 glycine의 효과를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 30분 동안 무산소에



**Fig. 3.** Effect of glycine on anoxia-induced inhibition of p-aminohippurate (PAH) uptake in rabbit renal cortical slices. Slices were exposed to 100% N<sub>2</sub> or 100% O<sub>2</sub> (control) for 30 min in the presence or absence of 5 mM glycine. Data are mean ± SE of four experiments. \*P<0.05 compared with control. #P<0.05 compared with N<sub>2</sub> alone.



**Fig. 4.** Effect of glycine on anoxia-induced depletion of ATP in rabbit renal cortical slices. Slices were exposed to 100% N<sub>2</sub> or 100% O<sub>2</sub> (control) for 30 min in the presence or absence of 5 mM glycine. Data are mean ± SE of four experiments. \*P<0.05 compared with control.



**Fig. 5.** Effect of glycine on anoxia-induced depletion of glutathione (GSH) in rabbit renal cortical slices. Slices were exposed to 100% N<sub>2</sub> or 100% O<sub>2</sub> (control) for 30 min in the presence or absence of 5 mM glycine. Data are mean ± SE of four experiments. \*P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with N<sub>2</sub> alone.

노출된 절편에서 PAH 이동의 S/M 비가 정상대조군의 8.01±2.49에서 1.93±0.47로 현저하게 억제되었고, 이러한 변화는 5 mM glycine 첨가로 유의하게 회복되었다. 정상대조군에 glycine을 첨가하였을 때는 유의한 변화가 없었다.

조직을 무산소에 노출시키면 세포대사가 억제되어 세포내 ATP 농도가 감소하게 되어 LDH 유출의 증가와 세포막 물질 이동계의 장애를 초래할 가능성이 많다. 따라서 아미노산의 방지효과가 이러한 ATP 농도 감소를 억제하여 세포손상을 방지할지도 모른다. 그 가능성을 시험하기 위하여 무산소에 노출된 심피질절편에서 ATP 농도 변화를 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 절편을 무산소에 노출시켰을 때 ATP 함량이 유의하게 감소하였으나, 이러한 변화는 glycine 첨가에 의해 영향을 받지 않았다.

Glycine이 절편내 GSH 함량에 변화를 초래하여 방지효과를 나타내는 지를 확인하기 위하여 무산소처리된 절편에서 GSH 함량의 변화를 조사하였다. Glycine이 정상조직에서는 GSH 함량에 영향을 미치지 못하였으나, 무산소처리로 유발된 절편내 GSH 감소를 유의하게 방지하였다 (Fig. 5).

## 고 찰

본 연구에서 glycine이 무산소에 의한 세포손상을 방지 하였는데 (Fig. 2) 이러한 결과는 이전에 다른 연구자들인 Weinberg 등과<sup>5,6,8,9</sup> Wetzels 등에<sup>10</sup> 의해 보고된 것과 일치한다. Glycine이 신장세포에서 무산소에 의한 세포손상 뿐만 아니라 세포대사억제물질은 Weinberg 등<sup>8,9</sup> 및 ATP 고갈은 Garza-Quintero<sup>1</sup> 등에 의한 세포손상을 방지하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 glycine이 어떤 기전으로 방지효과를 나타내는 지에 대해서는 알려진 바가 없다.

GSH는 신장세포에서 여러 종류의 세포손상을 방지하는 것으로 Meister에<sup>4</sup> 의해 알려져 있을 뿐만 아니라, 신장세포 내에서 glycine으로 대사 되기도 하고 또한 glycine 같은 아미노산들이 세포내에서 GSH로 합성될 수 있기 때문에 glycine의 방지기전과 GSH의 그것과는 서로 연관되어 있을 가능성이 Weinberg 등에<sup>6</sup> 의해 제시되었다. 본 연구에서도 GSH가 glycine과 같이 무산소에 의한 세포손상을 거의 완전히 방지하였다 (Fig. 2). 그러나 glycine의 방지효과가 GSH의 합성에 의한 것인 지와 GSH의 방지효과가 glycine에 의한 것인 지는 본 연구로서는 명확하지 않다.

여러 종류의 아미노산들의 방지효과가 아미노산의 종류에 따라 다르게 나타났는데 (Table 1), 시험된 아미노산 중에서 중성 아미노산인 glycine과 alanine이 다른 아미노산들에 비해 월등한 방지효과를 보였고, 중성 아미노산들 중에서도 amide side chain을 가지고 있는 asparagine, hydrocarbon side chain을 가진 leucine과 valine은 무산소에 의한 LDH 유출을 다소 감

소시키기는 하였지만 통계학적 유의성은 없었다. 그리고 염기성 아미노산인 lysine, histidine 그리고 arginine은 방지효과를 나타내지 못하였다.

이러한 실험 결과를 통해 간단한 구조를 가진 중성 아미노산이 무산소에 의한 세포손상을 방지하는 효과가 있음을 알 수가 있다. 본 실험 결과는 Weinberg 등에<sup>7</sup> 의해 분리된 근위 세노관을 이용한 실험 결과와 부분적으로 일치한다. 그들의 연구에서는 valine이 본 실험의 결과와는 달리 유의한 방지효과를 보였다. 그들도 아미노산이 방지효과를 보이는 것은 아미노산들의 구조가 중요한 역할을 할 것으로 예견하였다. 따라서 glycine과 alanine 같은 아미노산들이 방지효과를 나타내기 위해서는 이들 아미노산과 결합하는 고도로 특이한 반응체계가 존재함을 암시하고 있다.

LDH 유출로 세포손상을 평가하는 것은 세포의 비가역적인 손상 즉, 세포사멸을 측정하는 것이다. 그러나 세포가 비가역적인 손상까지 이르기 전에 기능적 손상이 나타날 가능성이 있고, 따라서 비가역적인 세포손상과 기능적인 손상 기전이 다를 가능성이 많다. 실제로 심피질절편을 이용한 실험에서 oxidant에 의한 LDH 유출이 세포막에서 능동적으로 이동하는 PAH 축적이나 Na-K-ATPase 활성의 억제 기전과 다른 것으로 Kim 등<sup>2</sup>에 의해 확인되었다. 따라서 본 연구에서 아미노산이 무산소에 의한 세포막의 기능적 손상시에도 방지효과를 보이는 지를 확인하기 위하여 무산소에 노출된 심피질절편에서 PAH 이동에 대한 glycine의 효과를 조사한 결과 glycine이 무산소에 의해 억제되었던 PAH 축적을 유의하게 방지하고 있었다 (Fig. 3).

신장근위세노관을 무산소에 노출시켰을 때 생체에서 허혈에 의한 신장세노관 손상시에서와 마찬가지로 세포내 ATP 함량이 급히 감소하는 것으로 Weinberg 등<sup>9</sup>에 의해 보고 되었고, 본 연구에서도 심피질절편을 무산소에 노출시켰을 때 세포내 ATP 함량이 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 ATP 함량의 감소가 무산소에 의한 세포손상 기전과 관련되어 있을 지도 모른다.

만약 ATP 고갈이 무산소에 의한 세포손상에 중요한 역할을 하고 있다면, glycine 같은 아미노산들이 세포내 ATP 농도를 증가시켜 방지효과를 나타낼 가능성이 있다. 그러나 본 실험 결과 glycine을 첨가한 절편이나 첨가하지 않은 절편이나 무산소에 노출시켰을 때 ATP 함량은 차이가 없었다. 그러나 glycine이 GSH의 함량은 유의하게 증가시키는 효과를 보였다 (Fig. 5).

결론적으로 본 연구의 결과는 아미노산들 중 glycine과 alanine이 다른 아미노산들에 비해 무산소에 의한 세포손상을 방지하는 효과를 보임으로서 아미노산의 구조적인 특징이 방지효과에 중요하게 작용하는 것으로 예상된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Garza QR, Weinberg JM, Ortega LJ, Davis JA and Venkatachalam MA (1993): Conservation of structure in ATP-depleted proximal tubules: role of calcium, polyphosphoinositides, and glycine. *Am J Physiol*, **265**: F605-F623.
- 2) Kim YK and Kim YH (1996): Differential effect of Ca<sup>2+</sup> on oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane functional integrity in renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol*, **141**: 607-616.
- 3) Lieberthal W and Nigam SK (2000): Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol*, **278**: F1-F12.
- 4) Meister A and Anderson ME (1983): Glutathione. *Annu Rev Biochem*, **52**: 711-760.
- 5) Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M and Rajan Y (1987): Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin Invest*, **80**: 1446-1454.
- 6) Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M and Kiani T (1989): Relationship between cell adenosine triphosphate and glutathione content and protection by glycine against hypoxic proximal tubule cell injury. *J Lab Clin Med*, **113**: 612-622.
- 7) Weinberg JM, Venkatachalam MA, Garza QR, Roeser NF and Davis JA (1990): Structural requirements for protection by small amino acids against hypoxic injury in kidney proximal tubules. *FASEB J*, **4**: 3347-3354.
- 8) Weinberg JM (1991): The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int*, **39**: 476-500.
- 9) Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Davis JA, Varani J and Johnson KJ (1991): Amino acid protection of cultured kidney tubule cells against calcium ionophore-induced lethal cell injury. *Lab Invest*, **65**: 671-678.
- 10) Wetzels JF, Wang X, Gengaro PE, Nemenoff RA, Burke TJ and Schrier RW (1993): Glycine protection against hypoxic but not phospholipase A2-induced injury in rat proximal tubules. *Am J Physiol*, **264**: F94-F99.