

# 황소개구리 안구에서의 아연, 타우린, 저온효과에 의한 시각 감수성 증진

김현정

경북대학교 생화학과

(2006년 11월 7일 받음, 2006년 12월 5일 수정본 받음)

안구 조직에는 많은 양의 아연과 타우린이 존재하며 특히 망막에서 맥락막에 이르는 부위에서의 분포가 두드러지고, 이는 아연과 타우린이 이들 조직에서 중요한 역할을 담당하리라는 것을 시사한다. 또한 시각 감수성에 영향을 미치는 또 다른 인자로서, 온도에 대한 연구들이 보고되고 있다. 그러나 지금까지의 많은 연구에도 불구하고 시각 순응계에서의 이들의 기능이나 상호작용은 명확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 변온동물의 일종인 황소개구리(bullfrog, *Rana catesbeiana*)의 안구를 이용하여 적정 농도의 아연과 타우린의 처리와 저온효과에 따른 망막전위도(ERG)와 흡수 스펙트럼의 변화를 관찰함으로써, 이들 인자들이 시각 감수성과 시각 순응에 미치는 효과를 알아보고자 하였다. 아연과 타우린의 효과를 알아보기 위한 이들의 적정 농도는 각각 10<sup>-4</sup> M과 10<sup>-5</sup> M로 결정하였고, 저온효과를 알아보기 위한 온도 변화 과정은 '25℃ → 5℃'를 거치게 하였다. 적정 농도의 아연과 타우린의 처리와 저온효과에 의해 망막전위도 실험 결과 역치(threshold)와 망막전위도 b-파의 크기가 증가하였고, 흡수 스펙트럼 분석 결과 400~ nm 범위에서의 흡광도 증가를 볼 수 있었다. 또한 아연과 타우린, 그리고 아연과 저온효과 간에는 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다.

주제어: 시각 감수성, 망막, 아연, 타우린, 저온효과, 망막전위도 기록, 흡수 스펙트럼 분석

## I. 서론

생체 내 중요 미량원소 중 하나인 아연은 400 여 종류 이상의 금속효소의 구조나 촉매활성에 관여하고 있으며 결핍 시 여러 증후군을 동반한다<sup>[1]</sup>. 아연은 인체의 여러 조직 중 안구에 많이 분포하며, 특히 망막에서 맥락막에 이르는 부분에는 400~ μg ; (건조중량)의 고농도로 존재한다<sup>[2-5]</sup>. 시각계와 관련

된 대표적 아연결핍증후군으로는 비정상적 암순응, 야맹증, 그리고 연령관련황반변성 등이 있으며, 이들 증후군은 시각계에 존재하는 특이적인 아연 결합 금속효소인 레티놀 탈수소효소의 작용과 직접적인 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>[6,7]</sup>. 즉, 아연이 결핍되면, 레티놀 탈수소효소의 작용이 원활하지 못하여 로돕신 합성이 저해되고 결국 비정상적 암순응을 유발하게 되거나, 비타민 A의 운반을 조절하는 레티놀 결합 단백질의 합성이 저해되어 비타민 A의

흡수, 수송, 활용 등이 감소됨으로써 시각 회로의 이상을 유발한다는 것이다.

타우린(2-aminoethanesulfonic acid)은 모든 동물 조직에서 많은 농도로 존재하는  $\beta$ -amino

sulfonic acid로서, 망막에는 다른 조직에 비해 고농도의 타우린이 존재하며 특히 망막에 저장된 유리 타우린의 절반 이상이 시세포층에 분포한다<sup>[8]</sup>. 타우린은 여러 조직에서 생체막을 안정화시키거나 중추 신경계에서 신경전달물질로서 역할을 한다<sup>[9,10]</sup>. 또한 시각계와 관련한 타우린의 작용으로는 과도한 광 자극이나 화학물질에 대해 간체 외절을 방어하거나, 칼슘의 결합과 흐름을 조절하며 단백질 인산화를 저해한다는 보고가 있다<sup>[11,12]</sup>.

온도는 생명체의 대사 반응에 직접적인 영향을 줄 수 있는 환경요소이며, 1℃ 온도 변화에 의해 약 20% 정도의 대사속도 변화를 야기한다. 체내의 화학 반응 및 효소활동은 온도 변화에 크게 영향을 받으며, 동물은 온도 변화에 대한 적응력을 가짐으로써 가변적 환경요소에 대처하고 있다. 변온동물은 외계 온도에 의해 체온이 변하는 동물로서 항상 일정한 체온을 유지하는 항온동물에 비해 외계와 신속한 온열교환이 일어난다. 온도와 시각계의 연관성에 대해서는 체온이나 상온보다 온도가 높은 고온상태를 만들거나 상온보다 온도가 낮은 저온상태를 만들어서 정상온도의 경우와 비교하는 연구가 행해져왔다<sup>[13-19]</sup>. 그러나 대부분 안내 관류법을 이용하여 안구 온도를 변화시켜주는 in vivo 실험이 주를 이루며, 저온효과에 대한 연구로는 고양이 안구에서 온도 하강으로 인해 망막전위도의 b-파가 증가된다는 보고와, 토끼 안구에서 망막과 망막색소상피층 간의 결합력 증대로 이들 간의 분리가 어려워진다는 보고가 있다<sup>[13,14]</sup>. 또한 변온동물과 관련된 저온효과 연구로는 6℃ ~ 0℃ 다양한 농도의 링거액을 개구리 망막에 관류시켰을 때 6℃ ~ 3℃ 서 암전류가 두드러지게 증가한다는 보고가 있으며, 금붕어, 잉어, 두꺼비 등을 이용한 연구에서도 유사한 결과가 보고되고 있다<sup>[15-19]</sup>.

시각 인지는 가시광선이 망막의 시세포 내 광수용 원반에 있는 시색소에 흡수되어 발생한 전기적인 전위가 뇌로 전달되는 일련의 전기·화학적 과정을

거친다. 1865년 Holmgren에 의해 처음 기록된 망막 전위도는 빛에 대한 안구의 반응으로 생긴 전기적인 신호를 나타낸 것으로, 일반적으로 시각 감수성을 나타내는 지표로 사용되며 임상에서는 망막의 손상이나 질환 유무 확인에 활용되고 있다. 또한 광 노출에 의해 망막이 붉은색에서 흰색으로 변하는 현상을 탈색이라 하며, 흡수 스펙트럼 분석을 통한 흡광도 비교로써 광반응의 정도를 알 수 있다<sup>[20]</sup>.

아연과 타우린은 안구 조직에 많이 존재하며 특히 망막에서의 두드러진 분포는 시각계에서 중요한 역할을 담당하리라는 것을 시사한다. 또한 시각 감수성에 대한 또 다른 영향 인자로 온도가 거론되고 있다. 그러나 많은 연구에도 불구하고 시각 감수성에 대한 이들의 기능이나 상호작용은 명확히 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 변온동물의 일종인 황소개구리 (bullfrog, *Rana catesbeiana*)의 안구를 이용하여 적정 농도의 아연과 타우린의 처리 및 저온효과에 따른 망막전위도와 흡수 스펙트럼의 변화를 비교함으로써, 시각 감수성에 대한 이들의 작용을 알아보았다. 또한 아연 특이성 킬레이트인 TSQ(N-[6-methoxy-8-quinoly]-p-toluene sulfonamide)를 처리함으로써 순수한 아연 효과인지를 검증하고, 아연과 타우린을 함께 처리하거나 아연 처리와 저온효과를 병행함으로써 이들 간의 상승작용의 존재 유무를 확인하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 실험동물 및 시료준비

변온동물인 황소개구리(*Rana catesbeiana*)를 실험동물로 사용하여 1시간 이상 암순응을 시킨 후, 안구를 적출하고 적도면을 따라 이등분하여 망막을 포함한 eyecup만을 취해 표준링거액(NRS, normal ringer solution)으로 헹군 뒤 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 표준링거액으로 105 mM NaCl, 205 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES(N-

[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])의 조성을 가지는 황소개구리 링거액 (bullfrog ringer solution)을 선택하였다. 그리고 용매로는 탈이온화된 이중증류수(DDW, deionized double distilled water)를 사용함으로써 실험용액내의 아연 및 다른 금속이온의 함량을 최소화 하

였다. 적정 농도로 만들어진 표준링거액은 pH를 7.4~.5로 맞춘 후, 산소결핍증으로 인한 세포 손상을 방지하기 위해서 100%의 산소를 지속적으로 공급하며 실험을 수행하였다. 또한 아연의 효과를 확인하기 위해 ZnCl<sub>2</sub>를, 아연 특이성 킬레이트로는 TSQ(N-[6-methoxy-8-quinoly] -p-toluene

Table 1. Classification of experimental conditions to examine the effects of zinc, taurine, and hypothermic process on visual sensitivity.

Classification	Medium temperature	Zinc treatment	TSQ treatment	Taurine Treatment
NRS	25℃	-	-	-
NRS+Zn	25℃	+	-	-
NRS+Zn&TSQ	25℃	+	+	-
NRS+Taurine	25℃	-	-	+
NRS+Zn&Taurine	25℃	+	-	+
NRS-C	25℃	-	-	-
NRS+Zn-C	25℃	+	-	-
NRS-H	25℃→ ℃→ 5℃	-	-	-
NRS+Zn-H	25℃→ ℃→ 5℃	+	-	-

\* NRS is an abbreviated word for normal ringer solution.  
 \* TSQ stands for N-[6-methoxy-8-quinoly]-p-toluene sulfonamide.

sulfonamide)를 사용하였고, 저온효과를 알아보기 위한 실험에서는 배양온도를 '25℃ (시간)→ ℃ (10분)→ 5℃ (10분)'로 변화시켰다. 황소개구리의 시각 감수성에 대한 아연과 타우린의 효과를 알아보기 위한 이들의 적정 농도는 각각 10<sup>-4</sup> M(10<sup>-2</sup> M ZnCl<sub>2</sub> 1 ml ringer solution)과 10<sup>-5</sup> M(10<sup>-2</sup> M taurine 100 μl ml ringer solution)으로 본 연구실에서 수행한 선행 실험의 결과를 참고하였다<sup>[5]</sup>. 본 연구에서 아연과 타우린의 효과 및 저온효과를 알아보기 위해 사용한 대조군과 실험군의 분류는 Table 1과 같다.

## 2. 광학시스템 및 망막전위도 기록

본 연구에 사용된 광학시스템은 할로겐램프의 광원으로부터 생성된 자극광은 광 자극 시간을 조절하

기 위한 셔터, 광량을 조절하기 위한 ND(neutral density) 필터, 505 nm | 일정한 파장의 광선만을 통과시키기 위한 간섭필터를 지난 후, eyecup 시료가 장착되어 있는 Modified Ussing chamber에 도달하여 일정 강도의 빛을 시료에 조사하도록 구성되었다<sup>[21]</sup>. 실험에 사용된 자극광의 세기는 ND0 일 때의 최대 광량이 1.95×10<sup>14</sup> photons/cm<sup>2</sup>/sec으로서 photo diode(United Detector Technology, USA)를 이용하여 측정하였고, 광 자극 시간은 200ms로 고정하여 망막전위도 기록 실험을 수행하였다.

광 자극으로 인해 시료의 감광 망막층 시세포에서 발생한 전기적 신호는 먼저 3% agar/ 3 M KCl의 agar bridge Ag-AgCl electrode에 의해 감지된 후, pre-Amplifier(AI 417, Axon Instruments, USA)와 D.C. main-Amplifier(CyberAmp380, Axon Instruments, USA)를 통해 증폭된 다음, AD/DA converter

(Digidata 1200A interface, Axon Instruments, USA)를 거쳐 컴퓨터에 입력되어 분석되었다.

### 3. 흡수 스펙트럼 분석

로돕신 재생 및 망막 탈색에 대한 아연, 타우린, 그리고 저온효과를 알아보기 위해 eyecup 시료로부터 망막만을 분리하여 흡수 스펙트럼 분석을 수행하였다. 먼저 암순응 된 eyecup 시료를 각각의 배양액에서 지속적인 산소공급과 함께 적절한 배양온도 하에서 배양시키고, eyecup 시료로부터 망막만을 분리하여 지지대에 올린 후 photo cuvette에 장착하고 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu UV 1601A, Japan)를 이용하여 400~ 700 nm 파장의 가시광선 영역에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 데이터 분석

망막전위도 기록 실험 데이터는 Axotape ver 2.0 프로그램에 의해 기록된 뒤 Axoscope ver 9.0 프로그램으로 분석하고, 흡수 스펙트럼 분석 실험 데이터는 UVPC ver 3.91 프로그램을 이용하여 분석하였다.

## III. 결과

### 1. 아연의 효과

일반적으로 외부 자극에 대해 반응을 나타낼 수 있는 최소한의 자극치를 역치라 하며, 본 연구에서는 망막전위도 상에서 전기적인 신호를 발생시킬 수 있는 최소한의 자극광의 세기를 역치로 정의하였다.  $10^{-4}$  M( $10^{-2}$  M  $ZnCl_2$  1ml 100  $\mu$ l inger solution)의 적정 농도의 아연 처리에 따른 b-파의 변화가 Fig. 1에 보여지며, 이때 가로축은 로그값으로 표현된 자극광의 세기를 나타내고 세로축은 b-wave의 상대적인 크기를 나타낸다. 이때 b-파의 상대적인 크기란 적정 농도의 아연을 처리한 실험군에서 자극광의 세기가 최대인 ND0 일 때 발생하는 b-파에 대

한 각 경우의 b-파의 크기 비를 의미한다. 모든 자극광의 세기에서 대조군인 표준링거액(NRS)에 비해 실험군인 적정 농도의 아연을 처리 한 경우(NRS+Zn) b-파의 크기가 증가하였으며, 이는 적정 농도의 아연 처리에 의해 시각 감수성이 증진된 결과라 할 수 있다.

적정 농도의 아연 처리에 따른 흡수 스펙트럼의 변화를 알아보기 위해 각각 대조군인 표준링거액(NRS)과 실험군인 적정 농도의 아연을 처리한 링거액(NRS+Zn)을 배양액으로 하여 eyecup 시료를 1시간동안 25℃ 서 배양한 후 암순응 상태의 흡광도를 측정된 결과가 Fig. 2에 나타나 있다. 그래프의 가로축은 가시광선 영역(400~ 700 nm)의 흡광도 측정 파장 범위를 그리고 세로축은 상대적인 흡광도를 의미한다. 이때 상대적인 흡광도란 적정 농도의 아연을 처리한 실험군에서 얻은  $\alpha$ -peak의 최대 흡광도에 대한 각 경우의 흡광도의 크기 비를 의미한다. 흡광도 측정 파장의 전 범위에서 적정 농도의 아연을 처리 한 경우 더 큰 흡광도 값을 가지며, 특히 500 nm 부근에서 로돕신을 구성하는 발색단에 의해 나타나는  $\alpha$ -peak에서의 차이가 두드러진다. 이는 아연이 광 노출에 의한 로돕신 탈색에 대해 방어 작용을 하며, 레티놀 탈수소효소의 활성을 증진시킴으로써 로돕신 재생을 촉진시킨 결과로 사료된다.

적정 농도의 아연 처리에 의한 황소개구리의 시각 감수성 증진 및 로돕신 탈색에 대한 방어 작용이 순수한 아연 효과 때문인지를 확인하기 위해, 여러 금속 이온 킬레이트 중에서 아연에 대한 특이성을 가진 TSQ를 선택하여 아연 효과에 대한 저해 작용을 실험하였다.  $10^{-3}$  M TSQ/ 3.3 M tris-HCl(pH 7.4)을 사용하여 아연의 작용을 억제하는 TSQ의 유효 농도를 측정하였다. 이때 유효 농도란 시료를 25℃ 표준링거액에서 배양한 후 505 nm 파장의 자극광을 ND2의 강도로 200 ms 동안 조사했을 때 발생하는 b-파의 크기를 기준으로 하여, TSQ 처리에 의해 b-파의 크기가 1/2로 감소할 때의 TSQ 농도를 의미한다. 실험 결과 500  $\mu$ l |  $10^{-3}$  M TSQ/ 3.3 M tris-HCl(pH 7.4)을 처리했을 때 전체 배양액 내의 TSQ 농도는  $2.5 \times 10^{-5}$  M이 되며, 이를 TSQ의 유효 농도로 결정하고 이후 아연 킬레이션 실험에 적

용하였다.

적정 농도의 아연 처리와 유효 농도의 TSQ 처리에 따른 망막전위도 기록과 흡수 스펙트럼 분석 결과가 Fig. 3과 Fig. 4에 각각 나타나 있다. Fig. 3은 망막전위도 기록 결과를 나타낸 것으로, 가로축은 배양액의 조성에 따른 실험군의 종류를 나타내고, 막대그래프를 위한 좌측의 세로축은 b-파의 절대크기를, 그리고 실선그래프를 위한 우측의 세로축은 역치의 절대크기를 나타낸다. 표준링거액을 배양액

treatment, absorbance across the spectral range is increased with a maximal absorbance difference about 500 nm( $\alpha$ -peak). Result represents the mean  $\pm$  SD of eight separate experiments.

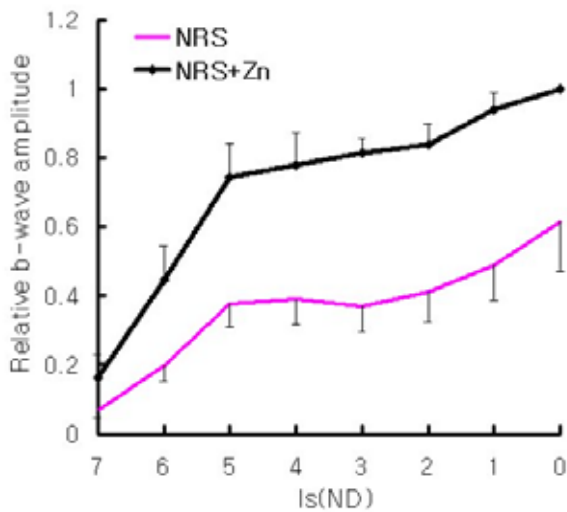


Fig. 1. V-log  $I_s$  curve for the relative b-wave amplitude before and after zinc treatment. The b-wave amplitude increases after zinc treatment on the whole range of stimulus light intensity. Result represents the mean  $\pm$  SD of ten separate experiments.

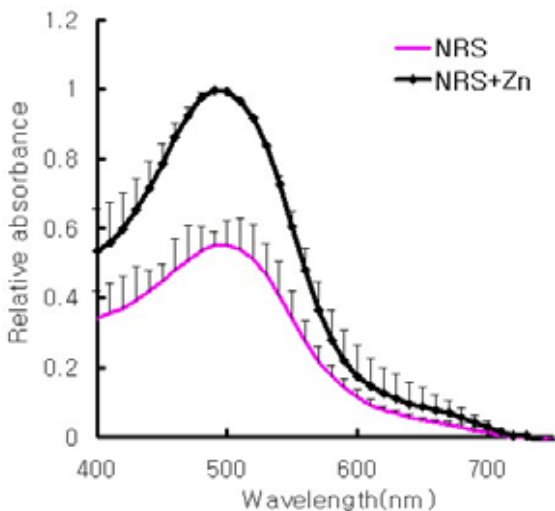


Fig. 2. Absorption spectra of the bullfrog retina before and after zinc treatment. After zinc

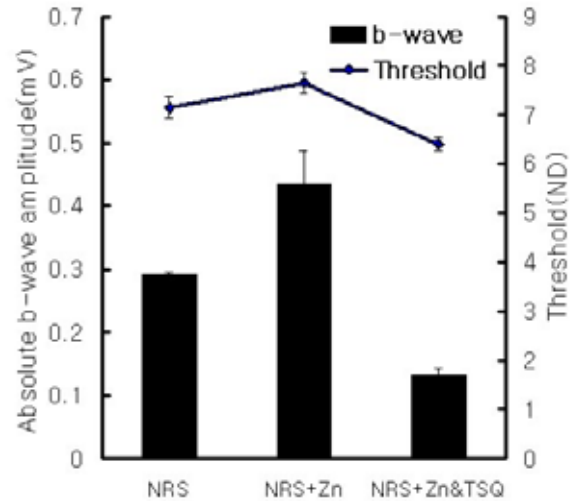


Fig. 3. B-wave amplitude and threshold changes after zinc and TSQ treatment. Both b-wave amplitude and threshold increase after optimal concentration of zinc treatment, but decrease with an effective concentration of TSQ treatment, as the zinc specific chelator. Result represents the mean  $\pm$  SD of ten separate experiments.

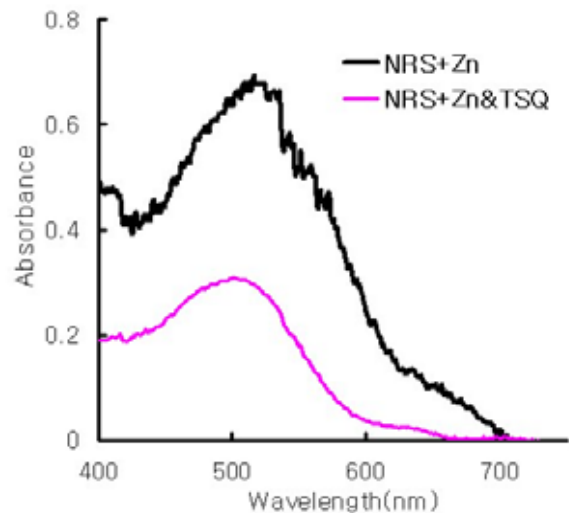


Fig. 4. Absorption spectra of the bullfrog retina before and after TSQ treatment during dark adaptation. The TSQ treatment of effective concentration( $2.5 \times 10^{-5}$  M) causes a distinct absorbance decrement through the whole scanning range with maximal absorption difference at  $\alpha$ -peak.

으로 사용한 경우(NRS)에 비해 적정 농도의 아연을 처리한 경우(NRS+Zn) b-파와 역치가 증가가 두드러지며, 여기에 유효 농도의 TSQ를 처리한 경우(NRS+Zn&TSQ) 증가했었던 b-파와 역치가 크게 감소함을 볼 수 있다. 흡수 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 Fig. 4에서 가로축은 흡광도 측정 파장 범위를 의미하고 세로축은 흡광도를 나타내며, 적정 농도의 아연을 처리한 경우(NRS+Zn)에 비해 유효 농도의 TSQ를 처리한 경우(NRS+Zn&TSQ) 전체 측정 파장 범위에서 흡광도가 감소함을 볼 수 있다. 이는 아연 특이성 킬레이트인 TSQ와 아연이 결합함으로써 세포 내  $\cdot$ 의 유리 아연의 수송이 중단되어 레티놀 탈수소효소의 활성이 저해되고, 로돕신 재생이 저하되어 시각 감수성이 감소된 결과로 사료된다.

## 2. 타우린의 효과

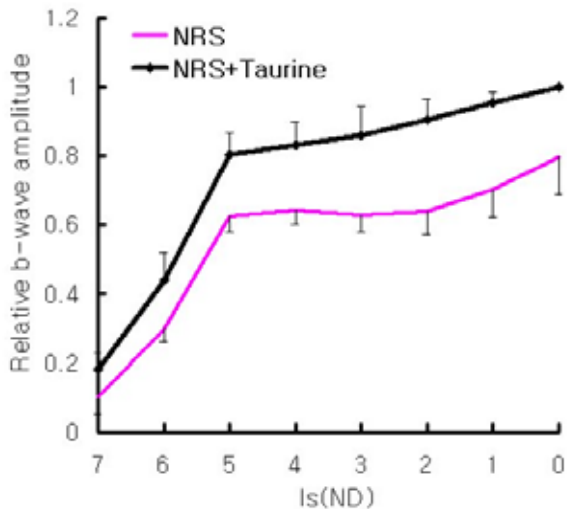


Fig. 5. V-log Is curve for the relative b-wave amplitude before and after taurine treatment. With treatment of optimal concentration of taurine, b-wave amplitude shows increase in all cases of stimulus light intensity. Result represents the mean  $\pm$  SD of ten separate experiments.

$10^{-5}$  M( $10^{-2}$  M taurine  $100 \mu\text{l}$  ml ringer solution)의 적정 농도의 타우린 처리에 따른 망막전위도 기록 실험과 흡수 스펙트럼 분석 결과가 Fig. 5와 Fig. 6에 각각 나타나 있다. 대조군인 표준링거액

(NRS)의 경우에 비해 실험군인 적정 농도의 타우린을 처리한 경우(NRS+Taurine) b-파의 크기와 흡광도가 증가함을 볼 수 있으며, 이 결과는 적정 농도의 아연을 처리했을 때와 유사한 경향을 보인다.

## 3. 아연과 타우린의 상승효과

적정 농도의 아연과 타우린을 함께 처리하여( $10^{-2}$  M  $\text{ZnCl}_2$  1 ml +  $10^{-2}$  M taurine  $100 \mu\text{l}$  ml ringer solution) 이들 상호간의 상승효과를 알아본 망막전위도 기록 실험 결과가 Fig. 7에 나타나 있다. 그래프에서의 가로축은 배양액의 조성에 따른 실험군의 종류를 나타내고, 막대그래프를 위한 좌측의 세로축은 b-파의 상대크기를, 그리고 실선그래프를 위한 우측의 세로축은 역치의 절대크기를 나타낸다. 표준링거액을 배양액으로 한 대조군(NRS)에 비해 적정 농도의 아연과 타우린을 각각 처리한 경우(+Zn, +Taurine) b-파와 역치가 증가하며, 특히 이들을 함께 처리한 경우(+Zn&Taurine) 그 증가가 두드러짐을 볼 수 있다. 이 결과로부터 황소개구리의 시각 감수성 증진에 있어 아연과 타우린은 상호 상승효과가 있다고 할 수 있다.

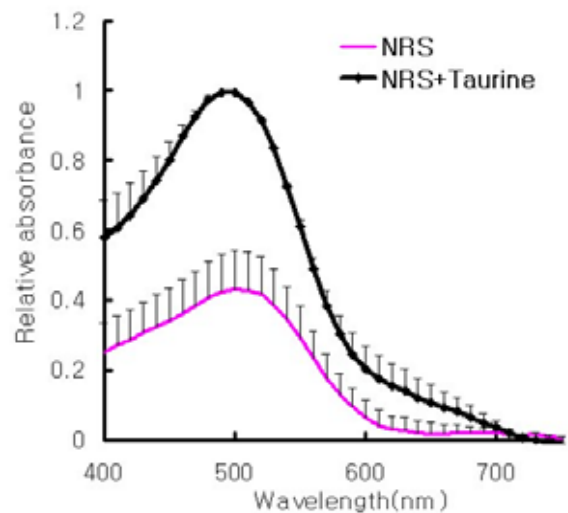


Fig. 6. Absorption spectra of the bullfrog retina before and after taurine treatment. With taurine treatment, all relative absorbance are increases strikingly throughout the spectral range. Result represents the mean  $\pm$ SD of eight separate experiments.

#### 4. 저온효과

변온동물의 일종인 황소개구리의 시각 감수성에 대한 저온효과를 알아보기 위한 실험에서 배양온도를 25℃ 유지하는 대조군(NRS-C)에 비해 실험군(NRS-H)은 25℃ 부터 생리적 저온 상태인 0℃ 지 점진적으로 온도를 내렸다가 다시 상온으로 온도를 회복시켜주는 과정을 통해 온도 자극을 주었다. 배양액의 온도 변화에 따른 망막전위도 기록 실험 결과가 Fig. 8에 보여지며, 이때 가로축은 배양온도의 변화를 나타내고 막대그래프를 위한 좌측의 세로축은 25℃ 표준링거액에서 배양된 대조군에 대한 각 배양온도에서의 b-파의 상대크기를 의미하며 실선그래프를 위한 우측의 세로축은 역치를 나타낸다. b-파와 역치의 크기는 배양온도의 저하에 따라 감소하다가 온도 회복과 함께 점차 증가하는 경향을 보이며, 특히 저온효과를 준 후 15℃ 서 두드러진 차이를 나타낸다. 따라서 황소개구리의 시각 감수성에 대한 저온효과를 확인 할 수 있다.

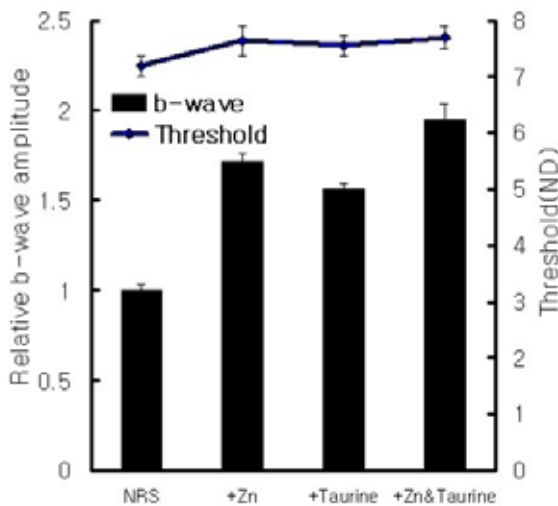


Fig. 7. Comparison of zinc, taurine, and Zinc & Taurine effects on b-wave amplitude and threshold. Both b-wave amplitude and threshold elevation are shown in all cases of treatment and are prominent in Zinc&Taurine co-treatment especially. Result represents the mean ±SD of ten separate experiments.

환경적 온도 변화가 변온동물의 망막 탈색에 미치는 영향을 알아보기 위해 저온효과 전 · 후의 흡수

스펙트럼 분석 결과가 Fig. 9에 보여지며, 이때 가로축은 흡광도 측정 파장 범위를 나타내고 세로축은 흡광도 값을 의미한다. 온도 변화에 대한 대조군의 경우(NRS-C) 시료의 배양온도를 25℃ . 일정하게 유지하고, 저온효과를 준 실험군의 경우(NRS-H) 배양온도를 상온(25℃ 에서 0℃ . 낮춘 뒤 다시 15℃ 로 회복시킨 후 암순응 시의 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 저온효과에 의한 전체 측정 파장 범위에서의 흡광도 증가를 볼 수 있으며, 특히 α-peak에서 두드러진 차이를 나타낸다. 이로써 망막 탈색에 대한 방어 작용 및 시각 감수성 증진에 대한 저온효과를 확인 할 수 있다.

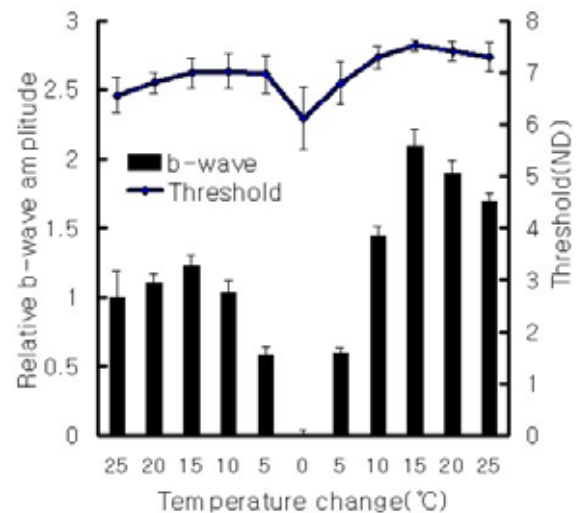


Fig. 8. Temperature dependent changes of b-wave amplitude and threshold. Both b-wave amplitude and threshold show the peak amplification rather than recovery after hypothermic-effect with maximal response at late 15℃. Result represents the mean ± SD of ten separate experiments.

#### 5. 아연과 저온효과의 상승효과

적정 농도의 아연 처리와 저온효과간의 상승효과를 알아보기 위한 망막전위도 기록 실험 결과가 Fig. 10에 보여지며, 이때 그래프의 가로축과 세로축은 Fig. 3에서와 동일하다. 표준링거액으로 25℃ 서 배양온도를 유지한 대조군(NRS-C)에 비해, 적정 농도의 아연을 처리하고 배양온도를 25℃ . 유지한 실험

협군(NRS+Zn-C)과 표준링거액을 배양액으로 하여 저온효과를 준 실험군(NRS-H)에서 b-파와 역치가 증가하며, 특히 적정 농도의 아연 처리와 저온효과를 병행한 경우(NRS+Zn-H) 그 증가가 두드러짐을 볼 수 있다. 이상의 결과로써 황소개구리의 시각 감수성 증진에 있어 아연과 저온효과는 상승효과가 있음을 확인 할 수 있다.

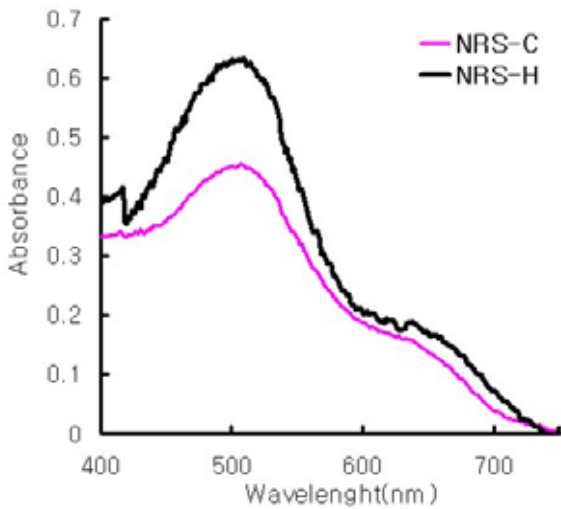


Fig. 9. Absorption spectra of the bullfrog retina before and after hypothermic-effect during dark adaptation. After hypothermic-effect, there is distinct absorbance increment through the whole scanning range.

#### IV. 고찰

망막은 시각에 가장 중요한 구실을 하는 안구 내 투명한 신경조직으로 10개 층으로 구성되며, 시세포 층을 구성하는 추체와 간체는 광선을 감지하여 생체 전기생리학적 신호로 전환하는 역할을 한다. 중심와에 밀집된 추체는 비교적 밝은 빛에 기능을 발휘하고 색각의 기능을 가지며 명순응에 관여한다. 또한 망막 주변부에 밀집한 간체는 비교적 어두운 빛에서 기능을 하며 녹색(505 nm)의 단일 파장에서 최대로 반응하고 암순응을 담당한다. 시세포의 외절에는 시색소를 포함하고 있는 광수용원반이 존재하고, 추체와 간체는 각각 이오돕신과 로돕신을 시색소로 가진

다. 로돕신은 단백질인 옵신과 비타민 A aldehyde의 일종인 11-cis-retinal이 결합된 형태이며, 광노출 시 11-cis-retinal은 구조적 변화를 일으키며 분리되어 망막색소상피층으로 확산된다. 그 후 레티놀탈수소효소의 작용에 의해 원래의 구조로 복원된 후 시세포 외절로 이동하여 옵신과 결합함으로써 로돕신이 재합성되고, 다음 광 자극에 대한 반응을 준비하게 된다<sup>[22]</sup>. 따라서 망막과 망막색소상피층간의 간격 및 결합정도, 로돕신 합성에 관련된 전구체의 원활한 수송, 그리고 관련된 효소의 활성이 시각 감수성에 중요한 영향을 미칠 것이 예측된다.

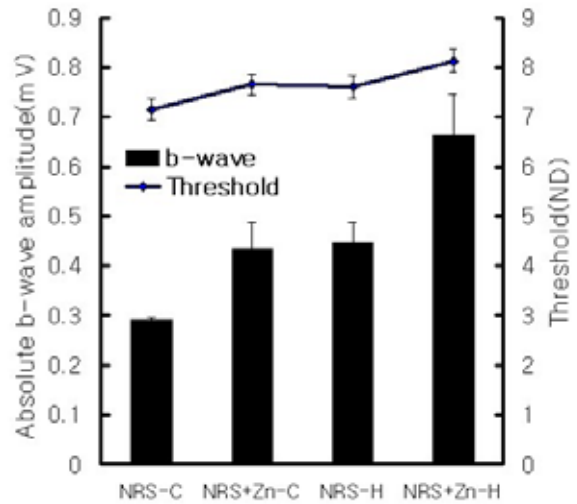


Fig. 10. Comparison of zinc treatment and hypothermic-effect on b-wave amplitude and threshold. Both b-wave amplitude and threshold increment are shown in all cases and those are prominent in case of zinc treatment with hypothermic-effect. Result represents the mean  $\pm$  SD of ten separate experiments.

일반적으로 망막전위도는 로돕신을 가진 시세포에 의한 a-파, 뮐러세포 및 양극세포에 의한 b-파, 망막색소상피층에 의한 c-파, 그리고 광 자극이 중단되었을 때 나타나는 d-파로 구성되며, 각 요소의 명확한 근원은 계속 연구 중이다<sup>[23]</sup>. 그리고 간체의 시색소인 로돕신의 흡수 스펙트럼은 레티날의 입체화학적 성질 및 옵신과의 공유결합을 반영하며,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -peak의 특수한 흡광도 peak값을 가지고 광노출 시 흡광도가 감소하는 성질이 있다<sup>[22]</sup>. 따라서



망막전위도와 기록과 흡수 스펙트럼 분석은 광 자극에 따른 시각 감수성 및 망막 탈색에 대한 좋은 지표로 활용될 수 있다.

현재까지 망막에서의 아연과 타우린의 작용 및 안내 관류법을 이용한 온도변화의 생리학적 작용에 대한 많은 연구가 수행되고 있으나 그 상호 연관성에 대한 연구는 미비하다<sup>[11,24,25]</sup>. 본 연구에서의 변온동물의 일종인 황소개구리를 실험동물로 선택하여 보다 외부 온도변화에 민감하게 반응을 나타내도록 하였고, 동면 후 비교적 영양상태가 양호하지 않은 이른 봄을 실험시기로 택함으로써 식이로써 아연 및 타우린 결핍 상태를 유발할 수 없는 실험적 제약을 극복하였다. 그리고 망막전위도 기록 실험과 흡수 스펙트럼 분석을 통해 시각 감수성 및 망막 탈색에 대한 아연, 타우린, 그리고 저온효과를 알아보았다.

아연과 타우린의 적정 농도는 각각  $10^{-4}$  M과  $10^{-5}$  M로서 본 연구실에서의 선행실험 결과를 적용하였다<sup>[4,5,26]</sup>. 동면 전 . 의 영양 상태에 따른 적정 아연의 농도의 차이는 없었으며 이 결과는 기본적인 시각계에서의 기능 유지를 위해 안구내의 아연 농도는 실험동물의 영양 상태와는 무관하게 일정하게 유지되는 것으로 사료된다.

적정 농도의 아연 및 타우린을 처리하거나 배양온도를  $25^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C} \rightarrow 5^{\circ}\text{C}$ 로 변화시켜 저온효과를 준 실험군의 경우, 망막전위도 b-파와 역치의 크기가 증가하였고 이는 시각 감수성 증대를 의미한다. 또한 500 nm 부근의 두드러진 흡광도 증가와 함께 400~ 600 nm 파장 범위의 가시광선 영역 전체에서 흡광도가 증가하였다. 이 결과는 이들 영향인자들이 광 노출로 야기되는 망막 탈색에 대해 방어 작용을 함을 의미한다. 결국 아연에 의한 레티놀 탈수소효소와 포스포디에스테라아제의 활성 증진과, 타우린의  $\text{Ca}^{2+}$  유입 조절로 인한 시세포 내의 cGMP 농도 변화와 동반된 망막의 막 구조 안정화의 결과 및 저온효과로 인한 망막과 망막색소상피층간의 결합을 증진하여 로돕신 합성에 필요한 전구체 수송이 용이하게 됨으로써 로돕신 재생이 촉진되어 시각 감수성 증대를 유발한 것으로 사료된다<sup>[6,7,11-14,16,27]</sup>.

그리고 아연 특이성 킬레이트인 TSQ를 처리한 경우, 적정 농도의 아연 처리에 의한 망막전위도 기록

이나 흡수 스펙트럼 분석 실험 결과에 나타났던 아연 효과들이 급격히 저해되었다. 따라서 적정 농도의 아연 처리에 의한 시각 감수성 증진이 순수한 아연 효과임을 알 수 있었다. 또한 적정 농도의 아연과 타우린을 함께 처리하거나 아연처리와 저온효과를 병행한 경우, 각각을 따로 처리한 경우에 비해 더 큰 망막전위도 b-파와 역치를 얻었으며, 이로써 시각 감수성 증진에 대해 이들 인자 간에 상승작용이 있음을 확인하였다.

## V. 결론

본 연구에서는 항온동물에 비해 외부 온도 변화에 민감하게 대처할 수 있는 특성을 가진 변온동물의 일종인 황소개구리를 실험동물로 하여 시각 감수성에 대한 아연, 타우린, 그리고 저온효과를 확인하였다. 망막전위도 기록 실험과 흡수 스펙트럼 분석 실험을 통해 얻은 결론은 다음과 같다.

먼저 적정 농도의 아연 및 타우린을 처리하거나 저온효과를 준 경우, 망막전위도 b-파와 역치의 크기 및 가시광선 영역의 흡광도가 증가하였다. 이는 아연에 의해 레티놀 탈수소효소와 포스포디에스테라아제의 활성이 증진되고, 타우린에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  유입이 조절되어 시세포 내의 cGMP 농도 변화와 함께 망막의 막 구조가 안정화되며, 저온효과에 의해 망막과 망막색소상피층간의 결합이 증진되어 로돕신 합성에 필요한 전구체 수송이 용이하게 됨으로써 로돕신 재생이 촉진되고 시각 감수성이 증대된 것으로 사료된다. 또한 아연 특이성 킬레이트인 TSQ를 처리한 경우, 적정 농도의 아연 처리에 의한 망막전위도 기록이나 흡수 스펙트럼 분석 실험 결과에 나타났던 아연 효과들이 급격히 저해되었으며 이로써 적정 농도의 아연 처리에 의한 시각 감수성 증진이 순수한 아연 효과임을 확인 하였다. 그리고 적정 농도의 아연과 타우린을 함께 처리하거나 아연처리와 저온효과를 병행한 경우, 각각을 따로 처리한 경우에 비해 더 큰 망막전위도 b-파와 역치를 얻었으며 이 결과로써 이들 영향인자들은 시각 감수성 증진에 상호 상승효과를 가짐을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- [1] Bertini I, Luchinat C, Maret W, and Zeppezauer M, "Zinc enzymes", 1st Ed., Birkhuser, Boston, USA, pp. 1-15(1986).
- [2] Vallee BL, "Biochemistry, physiology and pathology of zinc" *Physiol. Rev.*, 39(3):443-490(1959).
- [3] Karcioğlu ZA, "Zinc in the eye", *Surv. Ophthalmol.*, 27(2):114-122(1982).
- [4] Kim HJ, Kim YY, and Kim SY, "Effect of zinc on the visual sensitivity of the bullfrog's eye", *Kor. J Ophthalmol.*, 14:53-59(2000).
- [5] Kim HJ, and Kim YY, "Synergism between zinc and taurine in the visual sensitivity of the bullfrog's eye", *Journal of Photoscience*, 7(3):115-121(2000).
- [6] Ugarte M, and Osborne NN, "Zinc in the retina", *Prog. Neurobiol.*, 64(3):219-249 (2001).
- [7] Christian P, and West KP Jr, "Interaction between zinc and vitamin A : An update", *Am. J Clin. Nutr.*, 68(2):435S-441S (1998).
- [8] Orr HT, Cohen AI, and Lowry OH, "The distribution of taurine in the vertebrate retina", *J Neurochem.*, 26(3):609-611(1976).
- [9] Hanretta AT, and Lombardini JB, "Is taurine a hypothalamic neurotransmitter?: A model of the differential uptake and compartmentalization of taurine by neuronal and glial cell particles from the rat hypothalamus", *Brain Res.*, 434(2):167-201(1987).
- [10] Huxtable R, and Bressler R, "Effect of taurine on a muscle intracellular membrane", *Biochim. Biophys. Acta.*, 323 (4):573-583(1973).
- [11] Pasantes-Morales H, and Cruz C, "Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments", *J Neurosci. Res.*, 11(3):303-311(1984).
- [12] Lombardini JB, "Effects of taurine on calcium ion uptake and protein phosphorylation in rat retinal membrane preparations", *J Neurochem.*, 45(1):268-275(1985).
- [13] Yoon YH, and Marmor F, "Effects on retinal adhesion of temperature. cyclic AMP, cytochalasin, and enzymes", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29(6):910-914(1988).
- [14] Endo EG, Yao XY, and Marmor MF, "Pigment adherence as a measure of retinal adhesion : Dependence on temperature", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29(9):1390-1396(1988).
- [15] Wolin LR, and Massopust LC Jr, "Selective cooling of the eye", *Arch. Ophthalmol.*, 76(5):723-728(1966).
- [16] Donner K, Hemila S, and Koskelainen A, "Temperature-dependence of rod photoresponses from the aspartate-treated retina of the frog (*Rana temporaria*)", *Acta. Physiol. Scand.*, 134(4):535-541(1988).
- [17] Schellart NA, Spekrijse H, and Van Den Berg TJ, "Influence of temperature on retinal ganglion cell response and ERG of goldfish", *J Physiol.*, 238(2):251-267(1974).
- [18] Asano T, "Adaptative properties of the b-wave and the PIII in the perfused isolated carp retina", *Jpn. J Physiol.*, 27(6):701-716(1977).
- [19] Lamb TD, "Effects of temperature changes on toad rod photocurrents", *J Physiol.*, 346:557-578(1984).
- [20] Pak, WL, "Relation of bleaching to sensitivity of vertebrate photoreceptors", *Methods Enzymol.*, 81: 423-431(1982).
- [21] Kim HJ, Woo SH, Kim YY, Jung H, Kim SY, and Park EH, "Changes of ionic flow through the internal limiting membrane during the visual adaptation of vertebrate eye", *J Korean Ophthalmol. Soc.*, 41(7): 1479-1492(2000).
- [22] Fein A, and Szuts EZ, "Photoreceptors: Their role in vision". 1st Ed., Cambridge University Press, Cambridge. UK, pp. 49-115(1982).
- [23] Carr RE, and Siegel IM, "Visual electrodiagnostic testing: A practical guide for the clinician", 1st Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp. 9-11 (1982).
- [24] Hsu JM, and Anthony WL, "Zinc deficiency and urinary excretion of taurine 35S and inorganic sulfate 35S injection in rats", *J Nutr.*, 100(10):1189-1196(1970).
- [25] Jacobson SG, Meadows NJ, Keeling PW, Mitchell WD, and Thompson RP, "Rod mediated retinal dysfunction in cats with zinc depletion: comparison with taurine depletion", *Clin. Sci(Lond).*, 71(5):559-564(1968).
- [26] Kim HJ, Kim YS, Jung H, Kwon OS, and Kim YY. "The effects of zinc during visual adaptation of vertebrate eye", *Journal of Photoscience*, 2(2):63-67 (1995).
- [27] Grahn BH, Peterson PG, Gottaschall-Pass KT, and Zhang Z, "Zinc and the eye", *J Am. Coll. Nutr.*, 20(2):106-118(2001).

# Increase of Visual sensitivity by Zinc, Taurine, and Hypothermic-effect in Bullfrog's Eye

Hyun Jung Kim

Department of Biochemistry, Kyungpook National University

(Received November 7, 2006; Revised manuscript received December 5, 2006)

It has been reported high concentrations of zinc and taurine in ocular tissue, especially the retina-choroid, and the presence of physiological levels of zinc and taurine in these tissues seem essential for their normal function. In addition, several studies have reported temperature as another effector to the visual sensitivity. But, in spite of many studies, there are still remained many questions about their function and correlation in visual adaptation system. The purpose of present study was to clarify these points using electroretinogram(ERG) recording and absorption spectra scanning, before and after zinc and taurine treatments and hypothermic-effect in bullfrog(*Rana catesbeiana*) which is one of the poikilothermal animal. The optimal zinc concentration used in this study was determined  $10^{-4}$  M while the optimal taurine concentration was  $10^{-5}$  M, and temperature change for hypothermic-effect went through '25°C → 10°C → 5°C'. In ERG recording, it is obtained that dark-adapted threshold became elevated and b-wave amplitudes was increased with zinc and taurine treatment and hypothermic-effect. In absorption spectra scanning, there is distinct absorbance increment over the whole spectral range(400~ 700 nm after zinc and taurine treatment and hypothermic-effect. Furthermore there are some synergism effects between zinc and taurine as well as between zinc and hypothermic-effect as a result of co-treatment, respectively.

Key words: Visual sensitivity, Retina, Zinc, Taurine, Hypothermic-effect, Electroretinogram(ERG) recording, Absorption Spectra Scanning