

신장세뇨관에서 Ca^{2+} 이동에 미치는 부갑상선 호르몬의 영향⁺

박 전 홍

제주대학교 농과대학 수의학과

Effect of Parathyroid Hormone on Ca^{2+} Transport in Kidney Tubule Cells

Jun Hong Park

Dept. of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Cheju
National University

ABSTRACT

The present study was designed to investigate the effect of PTH on calcium (Ca^{2+}) transport through the luminal membrane and brushborder membrane of swine distal segments. Two membrane vesicles were incubated with the $Ca-45$ for 30 seconds, 1, 2, or 4 minutes, and rapidly filtered on Millipore 0.45 μ m filter. The calcium uptake was time dependent. Incubation with 10^{-8} M bPTH (1~34) decreased Ca^{2+} uptake by both vesicles, and 10^{-7} M bPTH (1~34) indicated less Ca^{2+} uptake by both vesicles. These results suggest that : 1) tubular vesicle is an useful calcium uptake model ; 2) PTH does not increase Ca^{2+} uptake by basolateral membrane vesicle and brushborder membrane vesicle of swine distal tubules.

이 연구는 '95 학년도 재단법인 제주대학교 발전기금 학술연구비에 의해 연구되었음.

서 론

칼슘이온은 세포내의 자극전도와 뼈의 생성에 중요한 기능을 하는 이온이다. 포유동물의 신장은 체내에서의 칼슘 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는데, 칼슘의 항상성을 유지하기 위하여 사구체에서 여과된 칼슘의 98 %는 재흡수되어야 한다 (Bindels, 1993). 부갑상선호르몬은 세뇨관에서 칼슘의 흡수를 촉진하는 것으로 추측되고 있다 (Hruska 등, 1983). 신장에서의 칼슘이동 특성에 관하여는 미세천자법 (Agus 등, 1973), 미세관류법 (Shareghi 와 Stoner, 1978), 막소포실험법 (Bouhtiauy

등, 1993)으로 원위세뇨관에서는 칼슘의 능동적 흡수가 일어나며 (Bindels, 1993), 비타민 D나 부갑상선 호르몬이 작용하는 것으로 생각되고 있다 (Bouhtiauy 등, 1993).

쥐의 근위세뇨관 세포배양시 배지에서 칼슘이온을 제거하면 세포내의 칼슘함량이 감소되며 부갑상선 호르몬에 의한 칼슘 흡수도는 증가되지 않거나 감소되었다 (Dolson 등, 1985). 이와 같은 차이는 동물의 종과 막소포의 제조방법의 차이에 기인하는 것으로 추정되고 있다. 신장피질에는 근위세뇨관과 원위세뇨관이 혼재되어 있으며, 원위세뇨관은 신장피질 단백질의 약 15%로 알려져있다. 세뇨관 막소포에서의 칼슘이동특성을 알기위해서는 여러 종의 동물에서 조사할 필요가 있다.

본 연구에서는 부갑상선 호르몬이 신장 세뇨관에서의 칼슘 이동에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 칼슘 동위원소를 사용하여 돼지의 신장막소포에서의 칼슘 흡수도를 조사하였다.

재료 및 방법

돼지 신장으로부터 sucrose-Percoll 농도경사 원심법으로 쇠모연막소포 (brushborder membrane, BBM)와 기저층막소포 (basolateral membrane, BLM)를 분리하였다 (Kinsella 등, 1979, Scalera 등, 1981) (그림 1). 적출된 신장을 냉각된 관류액 (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$)으로 관류시킨 후에 피질을 절제하였다. 피질무게의 10 배에 해당하는 250 mM sucrose와 20 mM HEPES, pH 7.6을 가하여 유리호모게나이저를 이용하여 20회 균질화시켰다. 이것을 1200 g로 10 분간 원심 분리하여 상등액을 보관하고, 침전물에는 5 배에 해당하는 sucrose-HEPES 완충액을 넣고 유리호모게나이저로 10 회 균질화시킨 후 전과 같이 원심하여 상등액을 합한다. 상등액을 9500 g로 15 분간 원심분리하여 침전물 위의 fluffy layer를 상등액에 부유시켜 25000 g로 30 분간 원심분리한다. 상등액은 버리고 fluffy layer를 sucrose-HEPES완충액에 부유시켜 26.5 ml로 만들고 여기에 Percoll (Pharmacia) 3.5 ml를 넣고 잘 흔들어준 다음 31000 g로 45 분간 원심분리한다. 원심관 상단에서 5~15 ml를 취한 것을 95000 g로 60 분간 원심분리한다. BLM (fluffy layer) 은 100 mM mannitol과 20 mM HEPES, pH 7.4에 부유시켜 37 $^{\circ}$ C 에서 30 분간 보존하였다가 4 $^{\circ}$ C 에서 보관하면서 칼슘이동 실험에 사용하였다.

막소포의 단백질 함량은 Bradford법으로 측정하였다 (Bradford, 1976). Coomassie brilliant blue 시약 1.5 ml를 단백질

표준액 또는 시료 0.1 ml와 혼합하고 실온에서 2분 후에 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. BBM부유액의 단백질은 0.80 µg/ml, BLM부유액의 단백질은 2.90 µg/ml였다.

부갑상선 호르몬은 아미노산 34 개로 이루어진 합성 bPTH (Sigma Co., St. Louis)을 물에 녹여 사용하였다. 칼슘흡수 실험시 100 mM NaCl, 40 mM choline chloride, 20 mM HEPES-Tris 용액에 칼슘동위원소 Calcium-45 (DuPont NEN, Boston)을 0.5 mM되도록 사용하였다. 칼슘흡수도는 막소포와 칼슘동위원소를 혼합하여 37°C에서 반응시킨 후에 냉각된 세척용액 (150 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM EGTA)을 넣고 끈 감압여과하였다. 여과지를 (Millipore HA, 0.45 µm) 세척용액으로 씻어준 다음에 남아있는 막소포내의 칼슘동위원소량을 베타선 동위원소계측기 (Packard Tri-Carb 2700TR)로 측정하였다.

결 과

막소포에서의 칼슘흡수도를 경시별로 조사한 결과는 표 1에 나타났다. 막소포의 칼슘 흡수도는 0.5 mM 칼슘에 배양시 1분까지는 흡수도가 증가되다가 일정한 상태를 4분까지 유지하였다. 부갑상선호르몬을 10⁻⁸ M 농도로 첨가하였을 때 1분간의 칼슘 흡수도는 약간 감소하였으며, 부갑상선호르몬을 10⁻⁷ M 농도로 첨가하였을 때 1분간의 칼슘 흡수도는 더욱 감소하였다 (표 2).

Swine Kidney

↓ Perfusion, 10x vol, 140mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂

Homogenized Cortex

↓ Cut cortex, Homogenize 10x vol, 20mM Herpes, 250mM Sucrose, pH7.6

↓ centrifuge homogenized cortex 1200 g, 10 min

Supernatant

↓ centrifuge supernatant 9500g, 15 min

Fluffy layer

↓ centrifuge sedimented fluffy layer 25000g, 30 min

Fluffy layer

↓ 20mM Herpes, 250mM Sucrose, pH7.6+3.5ml Percoll

↓ mix, centrifuge 31000g, 45 min

Supernatant 5-15 ml

↓ centrifuge 95000 g, 60 min

Fluffy layer

↓ 100mM Mannitol, 20 mM Herpes, pH7.4

↓ centrifuge upper 5-15 ml, 95000g, 60 min

Sedimented vesicle

↓ 100mM Mannitol, 20mM Herpes, pH7.4

↓ stand 37°C, 30 min

Calcium uptake study

Figure 1. Schematic flow diagram of renal tubular vesicle preparation

Table 1. Time course of calcium uptake in renal tubular vesicle (Unit : cpm)

Time	Basolateral Vesicle	Brushborder Vesicle
30 sec	21406	32936
1 min	27276	46676
2 min	20843	22650
4 min	27180	33393

Table 2. Calcium uptake in renal tubular vesicle treated with parathyroid hormone (Unit : cpm)

PTH	Basolateral Vesicle	Brushborder Vesicle
None	24777	67873
10 ⁻⁸ M	14577	25401
10 ⁻⁷ M	6390	22820

고 찰

부갑상선 호르몬은 토끼의 집합관에서는 칼슘이동을 촉진하였으나 원위세뇨관에서는 촉진작용이 없었으며, 원위세뇨관에서의 adenylyl cyclase의 활성을 촉진하지 못하였으나(Shimizu 등, 1990), 생쥐, 쥐와 사람의 원위세뇨관에서 부갑상선호르몬은 adenylyl cyclase를 활성화시키는 것으로 보고되었다 (Friedman 와 Gesek, 1993). 토끼의 원위세뇨관의 BLM 에서 부갑상선호르몬은 Na⁺/Ca²⁺의 교환과 칼슘이동을 촉진시키지만, 근위세뇨관의 BLM에서는 칼슘이동에 영향을 주지 않았다 (Lajeunesse 등, 1994). 막소포에서의 인산화과정을 통하여 세포내로의 칼슘이동을 증가시키며, 신장세포 배양시 배지에서 칼슘이온을 제거하는 경우에는 부갑상선호르몬의 칼슘이동에 미치는 작용이 없어졌다 (Hruska 등, 1986). 이처럼 부갑상선 호르몬이 세뇨관에서 칼슘의

흡수를 촉진하는 부위는 세뇨관의 부위와 동물의 종에 따라 다르다.

이번 실험에서는 돼지신장으로부터 막소포를 분리하여 칼슘흡수에 미치는 영향을 조사하였던 바 30 초까지 급격한 흡수도의 증가를 나타내다가 4 분까지 일정한 수준을 나타냈다. 이와 같은 결과는 Lajeunesse 등 (1994)의 토끼의 원위세뇨관 막소포에서 관찰한 칼슘흡수 경향과 비슷하다. 반응시간을 5 초와 10 초로 실시하기에는 정확한 시간측정이 어려워 이번 실험에서는 반응시간 30 초를 최초의 반응시간으로 정하였다.

부갑상선 호르몬을 1 분간 $10^{-7}M$, $10^{-8}M$ 농도로 처리하였을 때 막소포에서의 칼슘흡수는 호르몬 농도를 증가함에 따라 감소하였다. 부갑상선호르몬은 신장수질의 상행지와 원위세뇨관에서 칼슘의 흡수를 증가시키는 것으로 알려진 것에 (Matsunaga 등, 1994) 비하면 이번 실험의 결과는 예측하지 못한 것이었다. 세포수준에서의 부갑상선호르몬의 작용기전은 Friedlander과 Amiel (1994)에 의하면 첫째, 두 종류의 수용체 종류가 작용하며, 둘째, 수용체와 결합하여 근위세뇨관에서 Na/Pi cotransport와 Na/H exchanger를 억제하고, 셋째, 헨넬의 고리에서는 protein kinase A의 작용으로 이가 양이온의 흡수를 증가시키고, 넷째, 원위세뇨관에서는 apical calcium channel의 세포막내 삽입, 세포내 과분극, Ca-ATPase의 조절에 의하여 칼슘재흡수를 증가시키는 것으로 알려졌다. 부갑상선호르몬의 신장 세뇨관에서의 칼슘재 흡수 작용기전을 이해하는 것은 만성 신부전증시에 나타나는 부갑상선호르몬 과다분비현상과 관련되어 중요한 의미를 갖고 있다.

이번 실험의 결과 신장막소포를 이용하여 칼슘의 흡수도를 측정하는 기법을 확립하였으나, 부갑상선호르몬에 의한 칼슘 흡수의 저하가 동물의 종에 따른 차이인지는 확인하지 못하였다.

참고문헌

- Agus, Z, Chiu, PJS, Goldberg, M. 1973. Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium and phosphate. *Am. J. Physiol.* 224 : 1143-1148.
- Bindels, RJ. 1993. Calcium handling by the mammalian kidney. *J. Exp. Biol.* 184 : 89-104.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Bouhtiauy, I, Lajeunesse, D, Brunette, MG. 1993. Effect of vitamin D depletion on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the proximal and distal nephrons. *Endocrinology* 132 : 115-120.
- Dolson, GM, Hise, MK, Weinman, EJ. 1985. Relationship among parathyroid hormone, cAMP and calcium on proximal tubule sodium transport. *Am. J. Physiol.* 249 : F409-F416.
- Friedlander, G, Amiel, C. 1994. Cellular mode of action of parathyroid hormone. *Adv. Nephrol. Necker. Hosp.* 23 : 265-279.
- Friedman, PA, Gesek, FA. 1993. Calcium transport in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 264 : F181-F198.
- Hruska, KA, Goligorsky, M, Scoble, J, Tsutsumi, M, Westbrook, S, Moskowitz, D. 1986. Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium in renal proximal tubular primary culture. *Am. J. Physiol.* F188-F198.
- Hruska, KA, Mills, SC, Khalifa, S, Hammerman, MR. 1983. Phosphorylation of renal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 258 : 2501-2507.
- Kinsella, JL, Holohan, PD, Pessah, NI, Ross, CR. 1979. Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta.* 552 : 468-477.
- Lajeunesse, D, Bouhtiauy, I, Brunette, MG. 1994. Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron segments through different pathways. *Endocrinology* 134 : 35-41.
- Matsunaga, H, Stanton, BA, Gesek FA, Friedman, PA. 1994. Epithelial Ca^{2+} channels sensitive to dihydropyridines and activated by hyperpolarizing voltages. *Am. J. Physiol.* 267 : C157-C165.
- Scalera, V, Huang, YK, Hildemann, B, Murer, A. 1981. A simple isolation method for basal-lateral plasma membranes from rat kidney cortex. *Membr. Biochem.* 4 : 49-61.
- Shareghi, GR, Stoner, LC. 1978. Calcium transport across segments of the rabbit distal nephron in vitro. *Am. J. Physiol.* 235 : F367-F375.
- Shimizu, T, Yoshitomi, K, Kakamura, M, Imai, M. 1990. Effects of PTH, calcitonin, and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments. *Am. J. Physiol.* 259 : F408-F414.