대한신장학회지 : 제 18 권 제 2 호 1999

1)

말기 신부전 환자에서 구리와 아연 이온 농도가 적혈구의 Superoxide Dismutase 활성에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 생화학교실 및 혜인내과의원*

문 교 철 · 권 진 경*

<요 약>

말기 신부전 환자의 적혈구에서 superoxide dismutase 활성의 감소 원인을 밝혀 활성산소를 적절히 통제할 수 있는 방법을 찾고자 하는 노력의 일환으로 적혈구와 혈장의 구리 이온과 아연 이온의 농도를 측정하고 적혈구의 superoxide dismutase 활성을 동시에 측정하여 이를 비교 검토하였다. 말기신부전 환자에서 투석전 superoxide dismutase의 활성은 정상인에 비해서 감소되어 있었다($P < 0.05$). 혈액 투석 후에는 superoxide dismutase 활성이 투석전에 비해 증가되어 정상인과 비슷한 수치가 되었다($P < 0.05$). 투석전 혈장의 구리와 아연의 농도 변화는 superoxide dismutase의 활성과는 다른 양상을 보였다. 투석전 적혈구내의 구리와 아연 이온치는 정상 대조군에 비해 모두 감소되어 있었고($P < 0.001$), 혈액 투석 후 구리의 농도는 투석전에 비해 증가되었으나($P < 0.05$) 아연은 투석전에 비해 별다른 변화가 없었다. 이상의 실험 결과로 보아 적혈구내의 superoxide dismutase는 조효소인 구리 이온의 적혈구내의 농도에 영향을 받고 있으며 또한 조효소 이외에도 투석을 통해 제거되는 uremic toxin이 있어 이 효소의 활성에 영향을 미치고 있는 것이 아닌가 생각된다.

서 론

활성 산소(free radical) 는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자[1,2]로 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성 산소를 생성한다[1,2]. 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 활성산소는 반응성이 높아 생체 분자들의 구조와 기능을 변화시켜 신체에 손상을 끼치며 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 작용한다[1,2]. 이러한 과잉의 통제되지 않는 활성 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥 경화[3], 심장 질환[4], 암[5] 및 노화[5] 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 활성산소는 신장 질환 및 신장 질환에서의 합병증에 관여하는 것[6-8]으로 알려져 있다.

책임저자 : 문교철, 대구시 중구 동산동 194번지
계명대학교 의과대학 생화학교실
Tel : 053)250-7786, Fax : 053)252-1605

우리의 신체는 이러한 활성 산소가 가진 과잉의 손상 에너지를 유해하지 않은 물질로 전환시키거나 다른 분자들로부터 활성산소가 형성되는 것을 억제한다[10]. 신체 내에는 여러 종류의 항산화제가 존재하지만 이중 가장 강력한 것은 항산화 효소계로서, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase가 있다[10]. 이들 효소중 superoxide dismutase는 산소가 전자를 받아 생성되는 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 효소이다[10]. 이 효소의 작용 후 생성되는 과산화 수소는 glutathione peroxidase나 catalase에 의해 인체에 무해하게 바뀌어[10] 활성산소의 제거는 superoxide dismutase의 작용과 더불어 시작된다고 할 수 있다. 그리고 항산화 효소중 중요한 작용을 하는 superoxide dismutase는 정상적인 기능을 하기 위해서는 조효소인 구리와 아연 이온이 절대적으로 필요하다[10].

저자들은 말기신부전 환자에서, 적혈구는 산화적 손상을 받고 있으며[11] superoxide dismutase의 활성 저하가 그 원인중의 하나임을 보고하였다[11]. 따라서

말기신부전 환자에서는 superoxide dismutase의 활성을 정상화시키는 노력이 있어야 할 것으로 생각된다. 이를 위해서는 superoxide dismtase의 활성에 영향을 미치는 각종 요인들을 생각해 볼 수 있는데 그 중의 하나가 superoxide dismutase의 조효소로 작용하는 구리(copper), 아연(zinc)과 같은 무기물(mineral)이다.

이 연구에서는 말기신부전 환자에서 적혈구의 superoxide dismutase의 활성 변동 원인을 분석하여 향후 말기신부전 환자에서 활성산소를 적절히 통제함으로써 각종 합병증과 사망을 줄일 수있는 방법을 찾고자 하는 노력의 일환으로 적혈구와 혈장의 구리와 아연 이온의 농도 및 적혈구의 superoxide dismutase 활성을 동시에 측정하여 결과를 비교 검토하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

43±14세의 말기신부전 환자중 혈액 투석을 하는 14명의 환자를 대상으로, 남자가 9명, 여자가 5명이었다. 대조군은 신기능 및 신체 검사 소견상 정상 소견을 보인 13명으로 이들의 평균 나이는 43±12세였으며 남자가 10명, 여자가 3명이었다. 환자군과 정상 대조군 모두에서 활성 산소에 영향을 미치는 vitamin C와 E를 최근 1개월 이내 사용한 경험이 있는 환자와, 최근 1개월 이내에 수혈을 받은 경험이 있는 환자는 실험군에서 제외하였다. 혈액투석은 polymethyl methacrylate dialyzer(FILTRYZER ; Toray, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

2. 방 법

혈액의 채취는 혈액 투석 전후에 동맥혈 line으로부터 하였으며 3,000rpm으로 10분간 원심하여 혈장을 얻고 적혈구는 phosphate buffered saline으로 3회 세척한 후 차가운 증류수를 사용하여 용혈시킨 후 사용하였다. 구리와 아연 이온의 측정은 electrothermal atomic absorption법을 사용하였으며 이때 사용한 기계는 자동 시료 주입기가 부착된 Varian GTA-97와 SpectrAA-250 Plus였다. 적혈구에서 superoxide dismutase의 활성을 측정하기 위해 분리한 적혈구 시료에 Drabkin's 시약을 첨가하여 hemoglobin을 cyanmethemoglobin으로 전환시킨 후 사용하였다. Superoxide dismutase 활성은 alkaline dimethylsulfoxide를 superoxide anion-generating system으로 사용하여 cytochrome c가 환원되는 양을 측정하는 Hyland 등의 방법[12]을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 cytochrome c가 50% 환원되는 양으로 하였다.

3. 통계 처리

모든 값은 평균±표준 편차로 나타내었고, 혈액 투석 전후의 비교는 Student's paired t-test를 하였고 정상인과 환자군의 비교는 Student's nonpaired t-test를 사용하였다.

결 과

말기신부전 환자에서 투석전 superoxide dismutase의 활성은 정상인에 비해서 감소되어 있었다($P<0.05$, Fig. 1). 혈액 투석 후에는 superoxide dismutase 활성이 투석전에 비해 약 61%가 증가되어 정상인과 비슷한 수치가 되었다($P<0.05$, Fig. 1).

말기신부전 환자에서 투석전 적혈구내의 구리 이온치는 정상 대조군에 비해 감소되어 있었다($P<0.001$, Fig. 2). 혈액 투석 후에는 투석전에 비해 약 13%가 증가되었다($P<0.05$, Fig. 2).

말기신부전 환자에서 투석전 혈장의 구리 이온치는

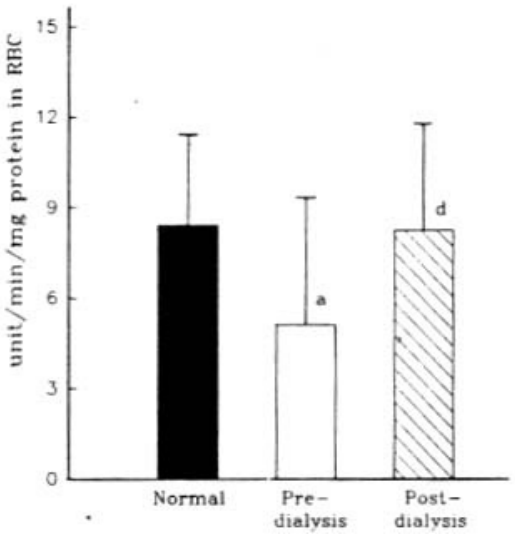

Fig. 1. *Superoxide dismutase activity in RBC. Significantly different from normal(a : P<0.05), and from predialysis(d : P<0.05).*

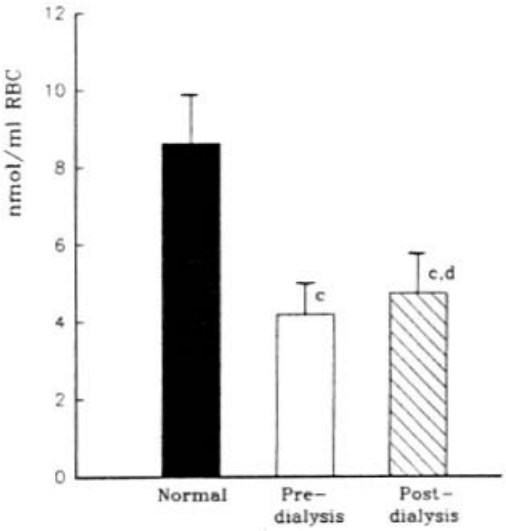

Fig. 2. *Copper level in RBC. Significantly different from normal(c : P<0.001), and from predialysis(d : P<0.05)*

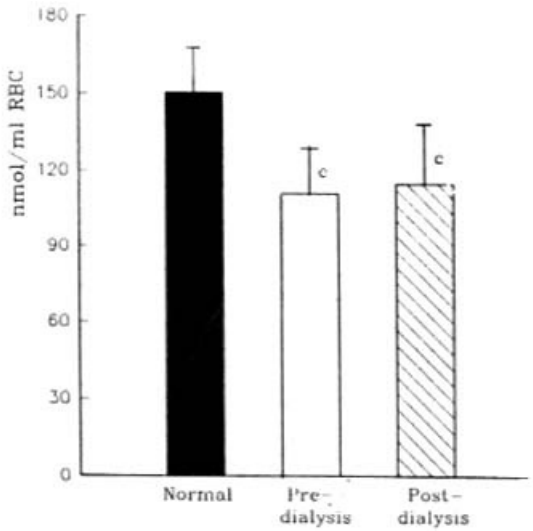

Fig. 4. *Zinc level in RBC. Significantly different from normal(c : P<0.001).*

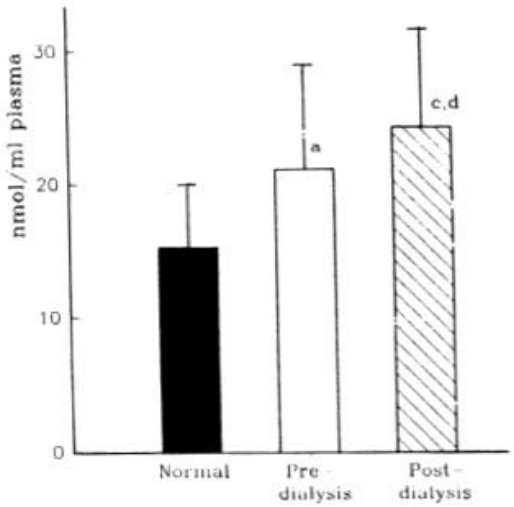

Fig. 3. *Copper level in plasma. Significantly different from normal(a : P<0.05, c : P<0.001) and from predialysis(d : P<0.05)*

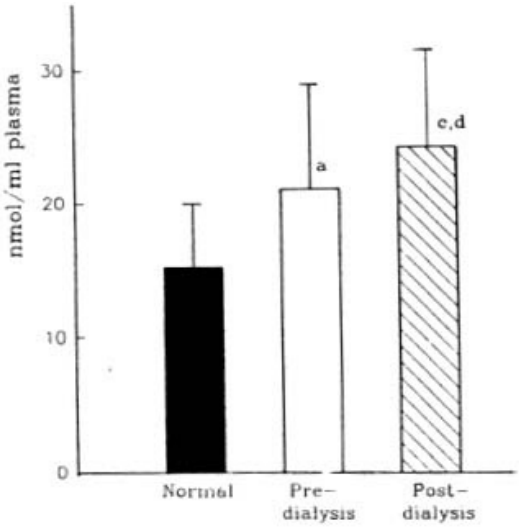

Fig. 5. *Copper level in plasma. Significantly different from normal(a : P<0.05, c : P<0.01) and from predialysis(d : P<0.05).*

정상 대조군에 비해 증가되어 있었다($P<0.05$, Fig. 3). 혈액 투석 후에는 투석전에 비해 약 15%가 더 증가되었다($P<0.05$, Fig. 3).

말기신부전 환자에서 투석전 적혈구내의 아연 이온치는 정상 대조군에 비해 감소되어 있었다($P<0.001$, Fig. 4). 혈액 투석 후에는 투석전에 비해 별다른 변화가 없었다(Fig. 4).

말기신부전 환자에서 투석전 혈장의 아연 이온치는 정상 대조군에 비해 증가되어 있었다($P<0.05$, Fig. 5). 혈액 투석 후에는 투석전에 비해 별다른 변화가 없었다(Fig. 5).

고 찰

저자들의 이전 연구[11]에서 보면 말기 신부전 환자의 적혈구는 superoxide dismutase의 활성이 감소되어 있으며 이로 인해 적혈구가 활성 산소에 의한 손상을 많이 받고 있었다. 이번 연구에서는 이러한 superoxide dismutase 활성 저하의 원인을 밝혀 활성산소를 통제할 수있는 적절한 방법을 찾고자 하는 노력의 일환으로 적혈구와 혈장의 구리와 아연 이온의 농도, 그리고 적혈구의 superoxide dismutase 활성을 동시에 측정하여 이를 결과를 상호 비교 검토하였다.

투석전 적혈구내 superoxide dismutase의 활성은 정상인에 비해서 감소되어 있었다. 투석 후에는 superoxide dismutase 활성이 투석전에 비해 약 61%가 증가되어 정상인과 비슷한 수치가 되었다. 이 성적은 저자들의 이전 연구[11]와 일치하였다.

말기신부전 환자에서 투석전 혈장의 구리 이온치는 정상 대조군에 비해 증가되어 있었고, 투석 후에는 투석전에 비해 약 15%가 더 증가되었다. 또한 투석전 환자 혈장의 아연 이온치도 정상 대조군에 비해 증가되어 있었으며 투석 후에는 투석전에 비해 별다른 변화가 없었다. 이렇게 이들 혈장의 구리 이온과 아연 이온은 superoxide dismutase의 활성 변동과 무관한 변화를 보였다. Richard 등[13]은 superoxide dismutase의 활성변화가 혈장 구리 이온이나 아연 이온의 농도와 직접적으로 연관이 있다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과로 볼 때 세포외액인 혈장의 구리 이온과 아연 이온치는 적혈구내의 superoxide dismutase의 활성에 직접적인 영향을 미치지는 못하는 것으로 생각된다.

말기신부전 환자에서 투석전 적혈구내의 구리 이온치는 정상 대조군에 비해 감소되어 있었고, 투석 후에는 투석전에 비해 약 13%가 증가되었다. 이렇게 말기신부전 환자에서 투석전 혈장의 구리 이온이 증가되어 있는데도 불구하고 적혈구내의 구리 이온치는 감소되어 있었다. Sechi 등[14]은 말기신부전 환자의 적혈구 막은 각종 이온의 이동에 대한 이상이 있는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험의 성적으로 볼 때 말기신부전 환자의 적혈구 막은 구리 이온에 대한 투과성이 감소되어 있다고 생각된다. 또한 본 실험에서 투석 후 적혈구내의 구리 이온의 농도가 증가하였는데 그 비율은 혈장의 구리 이온 농도의 증가 비율과 거의 같았다. 따라서 이는 혈액 투석으로 혈장의 구리 이온이 적혈구내로 유입되어 나타난 결과라 생각된다. 다만 혈장의 구리 이온농도가 투석 후에도 정상 대조군에 비해 여전히 증가되어 있는데도 불구하고 적혈구내의 구리 이온 농도가 완전히 정상으로 회복되지 않은 점을 볼 때 1회 투석으로 구리 이온에 대한 적혈구막의 투과성이 완전히 회복되지는 않는 것으로 생각된다. 또한 적혈구내의 구리 이온의 변화 양상이 superoxide dismutase의 활성 변화 양상과 같은 것을 볼 때 적혈구내의 superoxide dismutase의 활성 변화의 원인은 구리 이온의 농도 변화에 일부 기인된 것으로 생각된다. 그리고 superoxide dismutase의 변화는 투석전에 비해 투석 후 거의 정상화되었으나 구리 이온의 농도는 완전히 정상화되지는 못하고 투석 후에도 여전히 정상치 보다는 의의있게 감소되어 있는 점을 생각해 볼 때 말기신부전 환자의 적혈구의 superoxide dismutase의 활성은 구리 이온의 농도와 함께 혈액 투석으로 제거되는 uremic toxin에 의해 그 활성이 저해를 받고 있는 것이 아닌가 생각된다.

투석전 환자 적혈구내의 아연 이온치는 정상 대조군에 비해 감소되어 있었고, 투석 후에는 투석전에 비해 별다른 변화가 없었다. 이러한 아연 이온의 변화는 혈장의 아연 이온 변화와 유사하여 투석 전후에는 농도의 변화가 거의 없었다. 따라서 이는 아연 이온에 대한 적혈구 막의 투과성은 투석 전후로 큰 변화가 없는 것에 기인된 것으로 생각된다. 또한 superoxide dismutase의 변화와 아연 이온의 변화 양상이 다른 것으로 봐서 아연 이온의 농도는 투석 환자의 적혈구에서 superoxide dismutase의 활성에 구리 이온 만큼 영향을 주지는 못하는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과로 보아 적혈구내의 superoxide dismutase는 조효소인 구리 이온의 농도에 약간 영향을 받고 있으며 또한 구리 이온 이외에도 투석을 통해 제거되는 uremic toxin이 있어 이 효소의 활성에 영향을 미치고 있는 것이 아닌가 생각된다.

= ***Abstract*** =

Effect of Cu and Zn Levels on Superoxide Dismutase Activity in Erythrocytes from Patients with end Stage Renal Disease

Kyo-Cheol Mun and Jin-Kyung Kwon*

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, and Heain Clinic, Taegu, Korea*

Suppressed superoxide dismutase activity, which is responsible for the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide, is known to be one of the factors leading to lipid peroxidation in the erythrocyte membrane structures in the patients with end stage renal disease. In this study, copper and zinc levels were determined in the erythrocytes and plasma from 14 hemodialysis patients to explain the decreased activity of superoxide dismutase in erythrocytes. Before dialysis, superoxide dismutase, copper and zinc levels in erythrocytes were lower than those from healthy controls. Superoxide dismutase activity was normalized perfectly after hemodialysis. Copper level in the erythrocytes was normalized after hemodialysis, but its level was still lower than that in healthy controls. Zinc level in the erythrocytes was not changed after hemodialysis. Before hemodialysis, copper and zinc levels in plasma were higher than those from healthy controls. Copper level in the plasma was higher after hemodialysis than before hemodialysis. Zinc level in the plasma was not changed after hemodialysis. It is suggested that copper levels in erythrocytes from patients with hemodialysis affects partially to the superoxide dismutase activity, and superoxide dismutase activity is influenced more by copper levels than by zinc levels during hemodialysis.

Key Words : Copper, Hemodialysis, Superoxide dismutase, Zinc

참 고 문 헌

1) Punchard NA, Kelly FJ : Introduction. In : Punchard NA, Kelly FJ eds. Free radicals. A practical approach. Oxford : Oxford University Press, 1996, pp. 1-8
2) Moslen MT : Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In : Armstrong D ed. Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York : Plenum Press, 1994, pp. 17-27
3) Reaven PD: Mechanisms of atherosclerosis : Role of LDL oxidation. In : Armstrong D ed. Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press, 1994, pp. 113-128
4) Ferrari R : Oxygen free radicals at myocardial level : Effect of ischemia and reperfusion. In : Armstrong D ed. Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York : Plenum Press, 1994, pp. 99-112
5) Ames BN, Shigenaga MK : Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In : Halliwell B, Aruoma eds. DNA and free radicals. New York : Ellis Horwood, 1993, pp. 1-15
6) Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH : The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* **45**(Suppl 45)**:**S111-S115, 1994
7) Baud L, Ardaillou R : Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *British Medical Bulletin* **49:**621-629, 1993
8) Diamond JR : Reactive oxygen species and progressive glomerular disease. *J Lab Clin Med* **124:**468-469, 1994
9) Shurtz-Swirski R, Mashiach E, Kristal B, Shkolnik T, Shasha SM : Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron* **71:**176-179, 1995
10) Halliwell B, Gutteridge JMC : Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. In : Halliwell B, Gutteridge JMC eds. Free radicals in biology and medicine. Oxford : Clarendon Press, 1989, pp. 86-187
11) Mun KC, Joo I, Kim YH, Park SB, Kim HC : Effect of hemodialysis on levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes in erythrocytes from patients with end stage renal disease. *Korean J Nephrol* **17:**591-596, 1998
12) Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C : Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generation system. *Anal Biochem* **135:**280-287, 1983
13) Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C, Hachache T, Meftahi H, Laporte F, Foret M, Favier A, Cordonnier D : Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* **57:**10-15, 1991
14) Sechi LA, Orecchioni C, Melis A, Pala A, Tedde R : Trans-membrane cationic flow and hemodialysis. Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale. **66:**1001-1008, 1990.