

# N-ethylmaleimide (NEM) 가 개구리 피부의 $\text{Na}^+$ 이동에 미치는 영향\*

연세대학교 의과대학 생리학교실

송 선 옥 · 정 노 팔\*\* · 박 양 생

= Abstract =

## Effect of N-ethylmaleimide(NEM) on $\text{Na}^+$ Transport Across the Frog Skin

Sun Ok Song, Noh Pal Jung and Yang Saeng Park

Department of Biology the Graduate School Yonsei University

Studies have been conducted using isolated surviving skin of *Rana temporalia* in an attempt to evaluate the effect of N-ethylmaleimide (NEM) on the epithelial  $\text{Na}^+$  transport. Active transport of  $\text{Na}^+$  across the skin was estimated by measuring short circuit current (SCC).

NEM administered to the outside surface of the skin in concentration of  $0.5 \times 10^{-4}$  -  $2.5 \times 10^{-4}$  M induced 20~40% increase during the first 30 minutes, followed by a gradual reduction in SCC. With NEM above  $4 \times 10^{-4}$  M, SCC was inhibited from the beginning. Qualitatively similar results were obtained when NEM was added to the inside bathing medium. However, the concentration of NEM for a similar effect was much higher with the drug in the inside bathing medium than in the outside bathing medium.

The oxygen consumption of the skin was inhibited by NEM of above  $10^{-4}$  M, the effect being of approximately the same magnitude as that on SCC.

The activity of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase of the skin was not inhibited by NEM below  $10^{-3}$  M, but it was dramatically reduced with  $1.2 \times 10^{-3}$  M NEM.

The effects of NEM ( $10^{-4}$ ) on the SCC and oxygen consumption could be eliminated by adding cysteine ( $10^{-4}$  -  $10^{-3}$  M) in the medium, indicating that the SH group is involved in the action of NEM in the frog skin.

On the basis of these results, the mode of action of NEM on the  $\text{Na}^+$  transport across the frog skin was discussed.

### I. 서 론

개구리 피부는 상피세포를 통한 전해질 이동 과정을 연구하는데 그 모형으로서 널리 사용되고 있다.

개구리 피부는 피부 외측으로부터 내측으로  $\text{Na}^+$ 를 능동적으로 이동시키는데 그 과정은 다음과 같다. 즉,

먼저  $\text{Na}^+$ 는 상피세포의 외측막을 통하여 세포 내로 확산된 후 내측막에 존재하는  $\text{Na}^+$  펌프의 작용으로 피부 내측으로 운반된다(Ussing, 1960; Leaf, 1965; Herrera, 1971).

여러 연구자들의 연구보고에 의하면 평상시 개구리 피부를 통한  $\text{Na}^+$  이동은 외측막을 통한 이동 과정에 의하여 결정된다고 한다. 즉 내측막의  $\text{Na}^+$  펌프 기능은 세포 내  $\text{Na}^+$  농도에 의하여 조절되는데 세포 내  $\text{Na}^+$  농도는 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도에 의하여 결정된다. 그런데 평상시 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도는 그리 크지 않아 세포 내  $\text{Na}^+$  농도는  $\text{Na}^+$  펌프를 포화시킬 정도로

\* 본 연구는 1977~1978년도분

유한 연구비의 지원으로 이루어졌음.

\*\*연세대학교 이과대학 생물학과.

높지 않으므로 상피세포를 통한 Na<sup>+</sup> 이동량은 결국 외측막의 Na<sup>+</sup> 투과도에 따른다(Cereijido 등, 1964: Curran 등, 1963: Herrera 및 Curran, 1963). 따라서 단일 항이노호르몬(ADH)이나 amphotericin B 등을 처리하여 외측막의 Na<sup>+</sup> 투과도를 증가시키면 피부를 통한 능동적 Na<sup>+</sup> 이동이 증가되며 (Lichtenstein 및 Leaf, 1965: Mendoza 등 1967) amiloride (Bentley, 1968: Ehrlich 및 Crabbe', 1968), 고농도의 Ca<sup>++</sup>(Curran 등, 1963: Bonting, 1970: Walser, 1972) 등을 처리하여 외측막의 Na<sup>+</sup> 투과도를 감소시키면 능동적 Na<sup>+</sup> 이동이 감소된다.

한편 내측막의 능동적 Na<sup>+</sup> 펌프과정은 대사 에너지를 요하며 (Zerahn, 1961: Leaf, 1961: Geoffrey 등, 1965: Porter 및 Edelman, 1964: Sharp 등, 1966) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase가 이에 관여하고 있으므로 대사작용이 억제되거나 (Zerahn, 1961) ouabain과 같은 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 억제물질에 의해서도 (Koefold-Johnsen, 1957: Herrera, 1966) 능동적 Na<sup>+</sup> 이동이 감소된다.

그러므로 개구리 피부를 통한 Na<sup>+</sup> 이동은 외측막의 Na<sup>+</sup> 투과도가 증가될 때는 증가되며 외측막의 Na<sup>+</sup> 투과도가 감소되거나 대사 작용의 저하 혹은 ATPase 활성도의 저하로 Na<sup>+</sup> 펌프가 억제될 때는 감소된다.

여러 조직에서 SH기 결합물질 (SH reagent)들은 능동적 Na<sup>+</sup> 이동, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도 및 대사작용을 억제한다. 예를들면 n-ethylmaleimide (NEM)는 쥐 신장의 근위세뇨관에서 Na<sup>+</sup> 재흡수 및 신피질 조직의 산소소모량을 감소시키며 (Ullrich 등, 1973) 자라의 방광 (Shamoo 및 Brodsky, 1970: Shamoo 등, 1970), 두꺼비의 피부 (Park 및 Hong, 1976) 등에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase를 감소시킨다. 또 p-chloromercuric benzoate (PCMB) (Ullrich 등, 1973) 및 ethacrynic acid도 여러 조직에서 이와 유사한 영향을 나타내는 것으로 보고되어 있다. (Duggan 및 Noll, 1964: Comeau 1967: Nechay 등, 1967: Davis 1969: Banerjee 등, 1970: Epstein, 1972 a: Epstein, 1972 b: Bourgoignie 등, 1969).

따라서 저자는 본 실험에서 개구리 피부를 이용하여 상피세포를 통한 능동적 Na<sup>+</sup> 이동에 미치는 NEM의 영향과 그 기전을 구명하려하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 실험 재료

실험 동물로는 청명 지구의 산야에서 포획한 개구리

(*Rana temporaria*)를 실험실 내 수조에 기르며 실험에 사용하였다.

NEM (n-ethylmaleimide)은 Becton & Dickinson, CO. (New York, N.Y.) 제품으로 개구리 Ringer 용액에 녹여 10<sup>-2</sup>M 되는 stock 용액을 만들어 pH 7.4가 되게 tris로 적정하여 사용하였다.

### 실험 방법

1) 능동적 Na<sup>+</sup> 이동의 측정 방법: 개구리 피부를 통한 능동적 Na<sup>+</sup> 이동은 Ussing 및 Zerahn(1951)의 short circuit current (SCC) technique에 의하여 측정하였다. 즉 개구리 복부 피부를 분리하여 두 개의 lucite chamber 가운데 고정하고 양쪽 chamber 내에 개구리 Ringer 용액 (115mM NaCl, 2.5mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glucose)을 10 ml씩 채우고 용액, 중으로 산소를 계속 공급하였다. 개구리 피부의 내외의 전위차는 calomel 전극과 연결된 Boonton differential DC voltmeter amplifier (Model 98A)로 측정하고 chamber와 cellulose gum-Ringerbridge로 연결된 AgCl 전극을 통하여 외부에서 직류 전류를 보내어 전위차 (potential difference)를 0으로 만들때의 전류 즉 SCC를 측정하였다.

Ussing 및 Zerahn(1955)에 의하면 이 SCC는 능동적 Na<sup>+</sup> 이동량과 같다.

Na<sup>+</sup> 이동에 대한 약물의 영향을 조사할 때는 SCC가 적어도 20분 이상 안정된 값을 보여줄 때 약물을 피부 외측 또는 내측용액에 적당한 농도로 첨가한 후 5분 간격으로 60분간 SCC의 변화를 측정하였다.

2) 개구리 피부의 산소소모량 측정 방법: 피부 조직의 대사 작용에 미치는 NEM의 영향을 보기위하여 조직의 산소소모량을 biological oxygen monitor (Yellow Spring Instrument, Model 53)를 이용하여 측정하였다. 즉 복부 피부 약 0.3g과 대기중의 O<sub>2</sub>로 포화시킨 개구리 Ringer 용액 (NEM 농도 0~10<sup>-3</sup>M) 3 ml를 reaction chamber 내에 넣고 37°C로 유지하면서 30분간 산소소모량을 측정하였다.

이 때 용액 내에 녹아있는 산소의 양은 Henry의 법칙에 의거하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{즉 용존 산소량} = \alpha \times \frac{P_{O_2}}{P_B} \times V$$

단  $\alpha$ : 37°C 물에 대한 산소의 용해도

즉 0.2413 ml/ml H<sub>2</sub>O·atm P<sub>O<sub>2</sub></sub>

P<sub>O<sub>2</sub></sub>: 대기중의 산소 분압

P<sub>B</sub>: 대기압

V: 용액의 양

37°C, 1기압의 공기포 포화시켰을 때 3 ml의 용액내의 용존 산소량은 15.2  $\mu$ l인데 이 때의 용액내 산소포화도를 100%로 잡고 조직에 의하여 산소가 사용됨에 따라 나타나는 산소포화도의 변화를 biological oxygen monitor로 측정하여 조직 매 gm 당 산소소모량을 산출하였다.

3) 개구리 피부의  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 활성도 측정 : 개구리 복부 피부의 상피 조직은 Kawada 등 (1973)의 방법으로 분리하였다. 즉 피부를 1 N KI 용액에 30분간 담구어 둔 다음 여과지 위에서 작은 핀셋으로 상피 조직만을 분리하여 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 용액에 2번 세척하고 0.25 M sucrose, 5 mM EDTA, 0.1% Na-deoxycholate (Na-DOC) 및 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 포함하는 용액에 넣어 glass-glass hemogenizer로 갈았다. 이를 ultra-centrifuge (Sorvall Model RC-2B)에서 4°C 이하를 유지하며 24,000 g로 10분간 원심침전시킨 후 그 상층액을 분리하여 이를 ATPase 활성도 측정에 사용하였다. 즉 이 상층액 0.1 ml를 0.4 ml의 incubation 용액(100 mM NaCl, 10 mM KCl, 40 mM imidazol-EDTA buffer, pH 7.4)에 넣고 37°C에서 15분간 preincubation 한 후 3 mM  $\text{Mg}^{++}$ -ATP를 첨가하여 15분간 incubation 한 다음 1/6로 희석된 찬  $\text{HClO}_4$  (2 N) 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이에 증류수 0.5 ml를 가한 후 3,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액 내의 유리된 무기인산(Pi)양을 Fiske-SubbaRow (1929)의 비색법으로 측정하였다.

ATPase 활성도는  $\mu\text{moles Pi/mg protein/hr}$ 로 나타내었는데  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 활성도는 전체 ATPase 활성도에서  $\text{Mg}^{++}$  ATPase 활성도 (즉, incubation 용액에  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 이 없고 0.1 mM의 ouabain이 포함된 경우)를 제하여 산출하였다.

NEM의 영향을 조사한 경우에는 NEM을 preincubation 및 incubation 용액에 모두 포함시켰고 효소 제개의 단백질 농도는 Lowry 법(1951)에 의거하여 측정하였다.

### III. 실험 성적

#### 1) NEM이 SCC에 미치는 영향

제 1도는 NEM을 개구리 피부 외측 또는 내측 용액에 투여할 때 나타나는 SCC값을 NEM 투여 전 대조기의 값에 대한 백분율로 표시한 것이다.

NEM을 개구리 피부 외측 용액에 첨가한 경우에는

NEM 농도  $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서 SCC에 별 영향을 주지 않았으나  $1 \times 10^{-4} \text{M} \sim 5 \times 10^{-4} \text{M}$ 일 때는 약물 투여 후 초기(10~15분)에 SCC가 약 30%가량 증가하였고 시간이 지남에 따라 점차 감소하여 60분에서는 약물 투여전의 50~70%가 되었다. 그러나 NEM 농도가  $4 \times 10^{-4} \text{M}$  이상일 때는 초기 증가 현상이 나타나지 않고 계속 SCC가 억제되었는데 이 억제 효과는 약물 농도에 비례하였다.

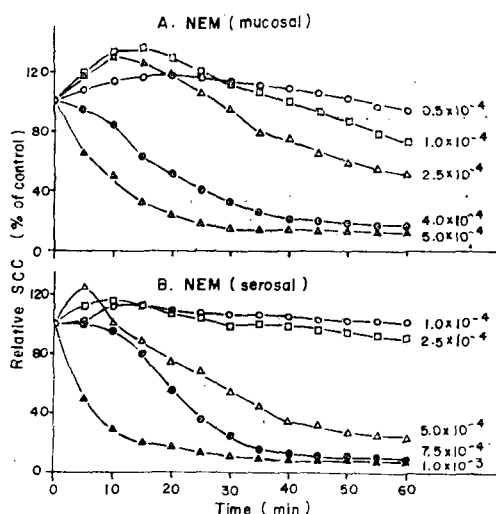
한편 NEM을 개구리 피부 내측 용액에 투여했을 때는 외측 용액에 투여했을 때와 정성적으로는 유사한 결과를 나타내었으나 동일한 효과를 나타내기 위해 필요한 약물 농도는 외측 용액에 투여했을 때보다 높았다.

이러한 관계를 좀 더 명확히 나타내기 위하여 NEM 투여 후 초기(외측 용액에서는 10~15분, 내측 용액에서는 0~5분) 및 60분후의 SCC 값을 NEM 농도별로 표시한 것이 제 2도이다.

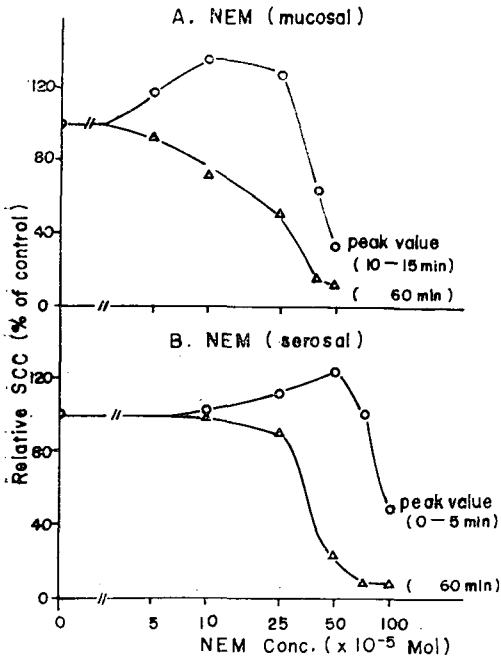
NEM을 외측 용액에 투여할 때(제2-A도)가 내측 용액에 투여할 때(제2-B도)에 비해 더 낮은 농도에서 SCC의 초기 증가와 60분후의 감소현상이 나타나기 시작함을 보여 준다.

#### 2) NEM이 개구리 피부의 산소소모량에 미치는 영향

NEM에 의한 SCC의 감소가 대사작용이 억제될 결과 나타나는 현상인지를 규명하기 위해 NEM이 피부



제 1도. 개구리 피부 외측(A) 또는 내측(B) 용액에 NEM을 투여했을 때의 SCC의 변화. 각 점은 5~7마리의 피부에서 얻은 값의 평균치임.



제 2 도. 개구리 피부 외측(A) 또는 내측(B) 용액에 NEM 투여 후 초기 및 60분대의 SCC의 변화 각 점은 5~7마리의 피부에서 얻은 값의 평균치 ± 표준오차를 나타냄.

조직의 산소소모량에 미치는 영향을 조사했다.

제 3 도는 개구리 피부의 산소소모량을 시간에 대한 함수로 표시한 것인데 각 직선의 경사도가 산소소모율을 나타낸다. NEM 농도가  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$ M 일 때는 산소소모율이 별 변화를 보이지 않았으나  $10^{-3}$ M에서는 현저하게 감소되었다.

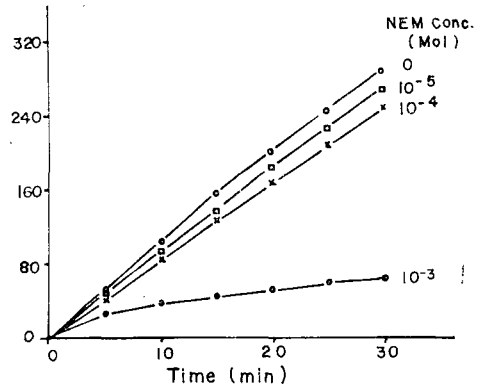
### 3. NEM 이 개구리 피부 상피조직의 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ATPase 활성도에 미치는 영향

개구리 피부의  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성도에 대한 NEM의 영향은 제 4 도에서 볼 수 있는 바와 같다.

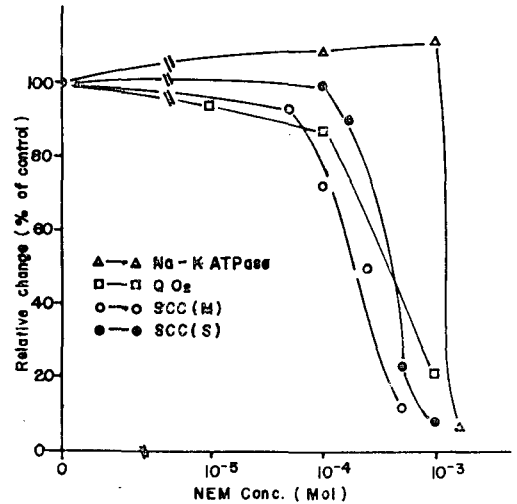
$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성도는 NEM 농도  $10^{-3}$ M 까지에서 별 변화를 받지 않았으나 그 이상의 농도에서는 현저하게 억제되었다. 이러한 사실은  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase에 대한 NEM의 영향이 산소소모율이나 SCC에 대한 영향보다는 몇배 이상의 농도에서 나타나기 시작함을 보여준다.

### 4. Cysteine 이 NEM 의 작용에 미치는 영향

NEM이 개구리 피부의 SH기에 결합하므로써 SCC



제 3 도. NEM 투여 후 개구리 피부 산소소모의 변화 각 점은 4마리의 피부에서 얻은 값의 평균치임

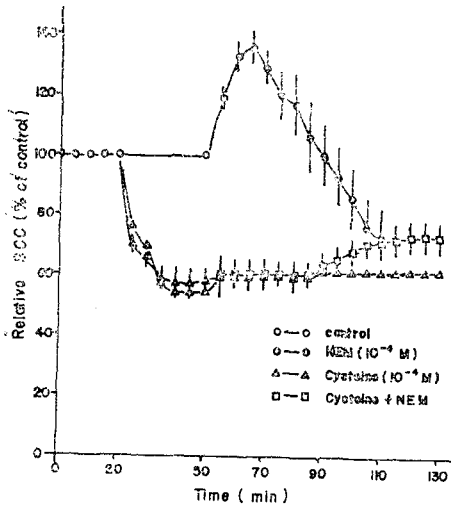


제 4 도. NEM이 개구리 피부의  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성도에 미치는 영향. 비교를 위해서 NEM 농도에 따른 피부조직의 산소소모율( $\text{QO}_2$ ) 및 SCC의 변화도 함께 나타내었음.

및 산소소모량에 영향을 미치는지를 규명하기 위하여 SH기를 포함하고 있는 아미노산인 cysteine으로 피부를 전처리한 후 NEM의 영향을 조사했다.

제 5 도는 SCC에 대한 실험결과인데  $10^{-4}$ M의 cysteine을 처리한 개구리 피부에서는 대조군에 비해 40% 정도 감소하였으나 NEM( $10^{-4}$ M)에 의한 SCC의 초기 증가와 후기 감소 현상이 모두 억제됨을 명확히 보여준다.

또 제 1 표에서 볼 수 있듯이 개구리 피부의 산소소모량은  $10^{-4}$ M NEM에 의하여 의의있게 억제되었으나



제 5 도. SCC에 대한 NEM의 작용이 cysteine에 의해 억제되는 양상.

각 점은 4마리의 피부에서 얻은 값의 평균치 ± 표준오차를 나타냄.

\*cysteine을 함께 투여했을 때는 이러한 억제 효과가 나타나지 않았다.

그러나 cysteine 자체는 산소소모량에 별 영향을 미치지 않았다.

제 1 표. Cysteine과 NEM에 의한 산소소모량의 변화 (산소소모량,  $\mu\text{l/gm}/30\text{min}$ )

Control	77.6 ± 1.9
Cysteine (10 <sup>-3</sup> M)	83.0 ± 7.4
NEM (10 <sup>-4</sup> M)	64.0 ± 5.3
Cyst. + NEM	89.2 ± 10.9

평균치 ± 표준오차

#### IV. 고 찰

NEM은 여러 분야의 연구에서 SH reagent로 널리 이용되고 있는데 이는 NEM이 SH기에만 선택적으로 결합하며 전기를 띄고 있지 않아 세포막을 쉽게 투과해 들어갈 수 있으므로 효과적인 SH reagent로 작용하기 때문이다(Webb, 1966).

NEM은 여러가지 효소 및 기타 단백질과 결합하여 대사 작용 및 조직의 기능을 억제한다. 예를 들면 NEM은 여러가지 조직에서 fructokinase (Ponz 및 Llinas, 1963), fructose-1,6-diphosphatase (Racker

및 Schroeder, 1958), glyceraldehyde-3-p-dehydrogenase (Weitzel 및 Schaeg, 1959), lactic dehydrogenase (Armstrong 등, 1960; Neilands, 1954), phosphoglucomutase (Milstein, 1961), phosphoglycerate kinase (Rao 및 Oesper, 1961) 등 해당작용에 관여하는 효소들과 pyruvate dehydrogenase (Goldman, 1960), succinate dehydrogenase. (Stoppani 및 Brignone, 1956; Nachlas 등, 1960) 등 TCA cycle 효소를 그리고 coenzyme QH<sub>2</sub>: cytochrome c oxidoreductase (Hatefi 등, 1962), cytochrome (Strittmatter 및 Valick, 1956) 등 전자 전달체를 억제하여 대사작용을 억제한다.

또한 NEM은 지방 (Bressler 및 Wakil, 1962), sterol (Goodman 및 Pepjak, 1960; Goodman, 1961) 및 단백질 (Borsook 등, 1957; Srinivasan 등, 1964; Younathan 등, 1964) 합성을 억제 하며, 신경 세포막의 SH기와 결합하여 신경의 전도활동을 억제한다 (Smith, 1958; Komalahiranya 및 Volle, 1963).

또한 NEM은 세포막을 통한 물질 이동을 직접, 간접으로 억제한다. 예를 들면 NEM은 조직의 포도당 축적에 대한 insulin의 효과를 감소시킨다. Insulin은 세포막과 disulfide link(S-S)를 형성함으로써 막에 결합된 후 포도당 이동을 촉진시키는 것으로 알려져 있는데, NEM은 세포막의 SH기와 결합하므로 insulin 결합을 억제한다고 한다(Cadenas 등, 1961).

NEM은 위의 parietal cell로부터의 위산 분비를 감소시킨다(Davenport 등, 1955; Hollander, 1956). 그 기전은 아직 상세히 모르고 있으나 coenzyme A의 SH기에 NEM이 결합하여 위산분비를 감소시킨다는 주장도 있다(Webb, 1966).

NEM은 적혈구의 SH기와 강력히 결합하여 포도당 이용과 lactate 생성을 억제하며 포도당의 촉진확산을 억제한다(Webb, 1966). 또 NEM은 적혈구로부터 K<sup>+</sup>의 손실을 유발하는데 이것이 NEM에 의하여 포도당의 섭취 및 해당작용이 감소된 결과인지(Tosteson 및 Johnson, 1957), NEM에 의하여 세포막의 K<sup>+</sup> 투과도가 증가된 때문인지 (Giebel 및 Passow, 1961) 혹은 적혈구의 glutathione이 NEM과 결합하여 사라지기 때문인지 (Jacob 및 Jandl, 1962)는 명확치 않다.

NEM은 근육 세포에서 D-xyrose 등 당의 이동을 억제하는데 이것은 NEM에 의하여 당운반체(carrier)의 SH기가 점령되기 때문이라고 설명되고 있다(Battaglia 및 Randle, 1959).

NEM은 staphylococcus의 세포막에서 phosphate

exchange diffusion 과정을 억제하는데 이러한 결과는 phosphate 운반체에 SH기가 존재하는 증거로 해석되고 있다(Mitchell, 1954).

상피조직에서의  $\text{Na}^+$  이동에 대한 NEM의 작용은 아직 많이 연구되어 있지 않다. Lodin 등 (1962)은 NEM이 개구리 피부의 전위차를 감소시킨다고 보고한 바 있으며 Ullrich 등 (1973)은 쥐신장의 근위 세노관의  $\text{Na}^+$  재흡수가 NEM에 의하여 억제됨을 보고한 바 있으나 그 이전에 대해서는 명확한 설명이 없다. NEM은 여러 상피조직에서 대사작용(Fahn 등, 1966; Hong 및 Park, 1971)과  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성도(Shamoo 및 Brodsky, 1970; Jean 및 Bader, 1970; Park, 및 Hong 1976)를 억제하므로  $\text{Na}^+$  이동을 감소시킬 것이라고 추측할 수 있으나 아직 계통적으로 연구된 바 없다.

본 실험에서 개구리 피부를 통한 능동적  $\text{Na}^+$  이동(SCC)에 미치는 NEM의 영향은 NEM 농도 및 투여 후 시간에 따라 달리 나타났다(제 1 및 2도 참조). NEM을 개구리 피부 외측에 투여했을 경우 NEM 농도가 낮을 때는 ( $5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) 초기에 SCC를 증가시켰으나 시간이 경과함에 따라 점차 억제시켰다. NEM을 높은 농도로 투여했을 때는 SCC의 초기 증가 현상이 나타나지 않았다. 이러한 현상은 NEM을 피부 내측에 투여했을 때도 나타났으나 동일한 효과를 나타내는데 필요한 NEM의 농도는 외측 용액에 투여할 경우보다 높았다.

이와 같은 NEM의 이중 효과는 Roberts 및 Rouser (1958)에 의해서도 관찰된 바 있는데 그들은 NEM ( $0.04 \text{mM}$ )을 개구리 피부 외측에 투여했을 때 초기에는 피부 내외의 전위차가 증가하다가 차차로 떨어진다 고 하였다.

NEM 투여 후 초기에 SCC가 증가한 것은 아마도 상피세포 외측막의  $\text{Na}^+$ 에 대한 투과도가 NEM에 의하여 증가한 것을 나타낸 것으로 생각된다. 개구리 피부를 통한  $\text{Na}^+$ 의 이동에 대한 rate-limiting step이 외측막을 통한  $\text{Na}^+$ 의 수동적 이동과정이므로(Cerejido 등, 1964) 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도가 NEM에 의하여 증가되지 않는한 SCC가 증가될 수는 없을 것이다. 세포막의  $\text{Na}^+$  투과도에 대한 NEM의 영향은 아직 연구 보고된 바 없으나 타 SH reagent인 mercurials가 신장세포막의  $\text{Na}^+$  leak permeability를 증가시키며(Kleinzeller 및 Cort, 1957),  $\text{Ag}^+$  이온이 쥐 대장에서 상피세포의 점막측막에 있는 SH기에 결합하여  $\text{Na}^+$  투과도를 증가시키고 그 결과 SCC가 증가된다(Clar-

kson 및 Toole, 1964)고 보고되어 있다. 흥미롭게도  $\text{Ag}^+$  이온은 개구리 피부를 통한  $\text{Na}^+$  이동(SCC)도 증가시키는데 (Curran, 1972; Walser, 1972; Gerencser 및 Cornette, 1977)  $\text{Ag}^+$  이온은 개구리 피부의 외측막에서 SH기와 결합하여 shunt permeability를 증가시킨다고 한다(Curran, 1972).

한편 SCC의 감소는 개구리 피부 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도가 감소 되던지 아니면 내측막의 능동적  $\text{Na}^+$  이동 기전이 억제될 때 나타날 수 있는데 본 실험에서 NEM이 어떻게 SCC를 감소시켰는지 그 기전을 명확히 알 수 없다. 그러나 NEM의 억제 효과가 SCC 및 조직의 산소소모율에 대해서 동일하며  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 활성도는 NEM 농도  $10^{-3} \text{M}$  이하에서는 감소되지 않는 것으로 보아 (제 4도 참조) SCC의 감소는 주로 대사작용이 억제된 결과 나타날 가능성이 많다. 그러나  $\text{HgCl}_2$ 와 같은 약물이 개구리 피부 외측막의 SH기에 결합하여 외측막의 저항을 증가시킴으로써 전위차를 감소시킨다는 보고도 있으므로(Lodin 등, 1964) NEM이 초기에는 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도를 증가시키지만 시간이 지남에 따라 투과도를 차차 감소시킬 가능성도 전혀 배제할 수는 없다.

그러므로 개구리 피부의  $\text{Na}^+$  이동에 대한 NEM의 이중효과는 상기세포 외측막의  $\text{Na}^+$  투과도에 대한 NEM의 영향이 시간적으로 달라지든지 아니면 NEM에 의한  $\text{Na}^+$  투과도 증가와 대사 억제 효과가 시간적으로 달리 작용하여 약물 투여 초기에는 투과도 효과만 나타나서 SCC가 증가되지만 시간이 지남에 따라 세포내로 이동된 NEM의 농도가 증가하여 대사작용이 심하게 억제되면 능동적  $\text{Na}^+$  펌프의 기능이 억제되기 때문에 나타나는 것으로 생각된다.

이러한 NEM의 영향은 그 기전 여하에 불문하고 개구리 피부의 SH기와 NEM이 결합된 결과 나타나는 것으로 추측되는데 이를 뒷받침하는 사실로써 NEM을 cysteine과 함께 투여했을 때 SCC 및 산소소모율에 대한 NEM의 효과가 나타나지 않으며 (제 5도 및 제 1표 참조) SH기가 많은 외측막(Lodin 등, 1964)에 NEM을 투여했을 때 SCC에 대한 영향이 큰 것(제 1 및 2도 참조)을 들 수 있다.

## V. 결 론

개구리 피부를 통한  $\text{Na}^+$ 의 이동에 미치는 NEM의 영향을 보기 위하여 SCC와 산소소모율 및  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$

ATPase 활성도를 측정하고 cysteine 투여시 NEM에 의한 SCC 및 산소소모율의 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피부 외측 용액에서 NEM은 SCC를 증가시켰으나 시간이 지남에 따라 농도에 비례하여 감소시켰다. 또한 내측 용액에 투여한 경우에도 이와 유사한 경향을 나타내었으나 동일한 크기의 영향을 나타내기 위해서는 더 높은 농도가 필요하였다.
2. 조직의 산소소모율은 NEM에 의해 억제되었는데 이것은 SCC의 감소와 유사한 농도에서 나타났다.
3. 상피 세포만을 분리하여 측정할 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도는 NEM 10<sup>-3</sup>M 이상의 높은 농도에서 억제되었다.
4. 전 투여된 cysteine은 NEM의 영향을 억제하였다.

이상의 결과는 NEM이 개구리 피부를 통한 Na<sup>+</sup>이동에 촉진 및 억제의 이중 효과를 나타내며, 이러한 NEM의 작용에는 아마도 SH기가 관여하고 있다고 사료된다.

## REFERENCES

- Armstrong, J. McD., Coates, J.H. and Morton, R.K.: *A new type of autoxidation reaction-flavin dissociation and inactivation of cytochrome b<sub>2</sub> by oxygen*. *Nature* 186:1033, 1960.
- Banerjee, S.P., Khanna, V.K. and Sex, A.K.: *Inhibition of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase by ethacrynic acid: Two modes of action*. *Mole. Pharmacol.* 6:680, 1970.
- Battaglia, F.C. and Randle, P.J.: *Monosaccharide transport in rat diaphragm muscle*. *Nature* 184:1713, 1959.
- Bentley, P.J.: *Amiloride, a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder*. *J. Physiol. (Lond.)* 195:317, 1968.
- Bonting, S.L.: *Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase and cation transport*. In *Membranes and Ion Transport*. (Edited by Bittar, E.E.) Vol. I. pp 257-363, Wiley-Interscience, London, 1970.
- Borsook, H., Fisher, E.H. and Keighley, G.: *Factors affecting protein synthesis in vitro in rabbit reticulocytes*. *J. Biol. Chem* 229:1059, 1957.
- Bourgognie, J., Klabr, S., Yates, J., Guerra, L. and Bricker, N.S.: *Characteristics of ATPase system of turtle bladder epithelium*. *Am. J. Physiol.* 217:1496, 1969.
- Bressler, R. and Wakil, S.J.: *Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XI. The product of the reaction and the role of sulfhydryl groups in the synthesis of fatty acid*. *J. Biol. Chem.* 237:1441, 1962.
- Cadenas, E., Kaji, H., Park, C.R. and Rasmussen, H.: *Inhibition of the insulin effect on sugar transport by N-ethylmaleimide*. *J. Biol. Chem.* 236:pp63, 1961.
- Cereijido, M., Herrera, F.C., Flanigan, W.J. and Curran, P.F.: *The influence of Na<sup>+</sup> concentration on transport across frog skin*. *J. Gen. Physiol.* 47:879, 1964.
- Clarkson, T.W. and Toole, S.R.: *Measurement of shortcircuit current and ion transport across the ileum*. *Am. J. Physiol.* 206:658, 1964.
- Comeau, R.W.: *A study of the effects of ethacrynic acid on ion permeability and electrical characteristics of the isolated frog skin*. *Physiology (Order No. 67-10, 125): 1130-B*, 1967.
- Curran, P.F.: *Effect of silver ion on permeability properties of frog skin*. *Biochem. Biophys. Acta*, 288:90, 1972.
- Curran, P.F., Herrera, F.C. and Flanigan, W.J.: *The effect of Ca<sup>++</sup> and antidiuretic hormone on Na<sup>+</sup> transport across frog skin. II. Sites and mechanisms of action*. *J. Gen. Physiol.* 46:1011, 1963.
- Davenport, H.W., Chave, V.J. and Davenport, V.D.: *Inhibition of gastric acid secretion by iodoacetate amide and N-Ethyl Maleimide*. *Am. J. Physiol.* 182:221, 1955.
- Davis, P.W.: *Inhibition of renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid*. *Biochem. Pharmacol. Vol. 19, pp 1983*. Pergamon Press. 1970. Printed in Great Britain, 1969.
- Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane-adenosine triphosphatase of renal cortex*. *Arch:*

- Biochem. Biochem. Biophys.* 109:388, 1964.
- Ehrlich, E.N. and Crabbé, J.: *The mechanism of action of amipramizide.* *Pflügers Arch.* 302: 79, 1968.
- Epstein, R.W.: *The binding of ethacrynic acid to rabbit kidney cortex.* *Biochem. Biophys. Acta.* 274:119, 1972a
- Epstein, R.W.: *The effects of ethacrynic acid on active transport of sugars and ions and on other metabolic processes in rabbit kidney cortex.* *Biochem. Biophys. Acta.* 274:128, 1972b.
- Fahn, S., Hurley, M.R., Koval, G.J. and Albers, R.W.: *Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organ. KK. Effects of N-ethylmaleimide and other sulfhydryl reagents.* *J. Biol. Chem.* 241:1890, 1966.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *Phosphocreatine.* *J. Biol. Chem.* 81:629, 1929.
- Geoffrey, W., Sharp, G. and Leaf, A.: *Metabolic requirements for active sodium transport stimulated by aldosterone.* *J. Biol. Chem.* 240: 4816, 1965.
- Gerencser, G.A. and Cornette, K.M.: *Effect of silver chloride on the short-circuit current across the isolated toad skin.* *Life. Scien.* 20: 1883, 1977.
- Giebel, O. and Passow, H.: From Webb, J.L. (1966): *N-ethylmaleimide.* In *Enzyme and Metabolic Inhibitors.* pp 337-365. Academic Press, New York and London, 1961.
- Goldman, D.S.: From Webb, J.L. (1966): *N-ethylmaleimide.* In *Enzyme and Metabolic Inhibitors.* pp 337-365. Academic Press, New York and London, 1960.
- Goodman, D.S.: *Studies on the conversion of squalene to sterol with rat liver enzymes.* *J. Biol. Chem.* 236:2429, 1961.
- Goodman, D.S. and Popják, G.: From Webb, J.L. (1966): *N-ethylmaleimide.* In *Enzyme and Metabolic Inhibitors.* pp 337-365. Academic Press, New York and London, 1960.
- Hatefi, Y., Haavik, A.G. and Griffiths, D.E.: *Studies on the Electron transfer system. XII.* *Reduced coenzyme Q(QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase.* *J. Biol. Chem.* 237:1681, 1962.
- Herrera, F.C.: *Action of ouabain on sodium transport in the toad urinary bladder.* *Am. J. Physiol.* 210:980, 1966.
- Herrera, F.C.: *Frog skin and toad bladder.* In *Membrane and Ion Transport.* (Edited by Bitter, E.E.). 3:1-47 Wiley-Interscience, London, 1971.
- Herrera, F.C. and Curran, P.F.: *The effect of Ca<sup>++</sup> and antidiuretic hormone on Na<sup>+</sup> transport across frog skin, I. Examination of interrelationships between Ca<sup>++</sup> and hormone.* *J. Gen. Physiol.* 46:999, 1963.
- Hollander, F.: *Inhibition of gastric secretion in vivo by iodoacetamide and N-Ethyl Maleimide.* *Am. J. Physiol.* 187:231, 1956.
- Hong, S. K. and Park, Y.S.: *Transport of bromocresol green in the rabbit kidney slice.* *Am. J. Physiol.* 221:1779, 1971.
- Jacob, H.S. and Jandl, J.H.: *Effect of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of Hemolysis.* *J. Clin. Invest.* 41:779, 1962.
- Jean, D.H. and Bader, H.: *Activation and inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase by N-ethylmaleimide.* *Biochem. Biophys. Acta.* 212:198, 1970.
- Kawada, J., Taylor, R.E. and Barker, S.B.: *Some biochemical properties of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in frog epidermis.* *Comp. Biochem. Physiol.* 50A: 297, 1973.
- Kleinzeller, A. and Cort, J.H.: *The mechanism of action of mercurial preparations on transport processes and the role of thiol group in the cell membrane of renal tubular cells.* *Biochem. J.* 67:15, 1957.
- Koefoed-Johnson, V.: *The effect of g-strophanthin (ouabain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin.* *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 145, 42:87, 1957.
- Komalahiranya, A. and Volle, R.L.: *Alterations of transmission in sympathetic ganglia treated with a sulfhydryl group inhibitor, N-ethylmaleimide (NEM).* *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 139:304, 1963.



- Leaf, A.: *Some observations on transport across the toad bladder in vitro. In Membrane Transport and Metabolism. (Edited by Kleinzeller, A. and Kotyk, A) pp 247~255. Academic press, New York, 1961.*
- Leaf, A.: *Transepithelial transport and its hormonal control in toad. Ergeb. Physiol. 56:216, 1965.*
- Lichtenstein, N.S. and Leaf, A.: *Effect of amphotericin B on the permeability of the toad bladder. J. Clin. Invest. 44:1328, 1965.*
- Lodin, Z., Janáček, K. and Müller, J.: *The localization and effects of mercury bound by the surviving frog skin. J. Cellular. Comp. Physiol. 62:215, 1964.*
- Lowry, O.H., Roserbrough, N.D., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265, 1951.*
- Mendoza, S.A., Handler, J.S. and Orloff, J.: *Effect of amphotericin B on permeability and short circuit current in toad bladder. Am. J. Physiol. 213:1263, 1967.*
- Milstein C.: *Inhibition of phosphoglucomutase by trace metals. Biochem. J. 79:591, 1961.*
- Mitchell, P.: *From Webb, J.L. (1966): N-ethylmaleimide. In Enzyme and Metabolic Inhibitors. pp 337-365. Academic Press, New York and London, 1954.*
- Nachlas, M.M., Margulies, S.I. and Seligman, A. M.: *A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity. J. Biol. Chem. 235:499, 1960.*
- Nechay, B.R., Palmer, R.F., Chinoy, D.A. and Posey, V. A.: *The problem of  $Na^+ - K^+$  adenosine triphosphatase as the receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid. J. Pharmacol. Exp. Therap. 157 (3):599, 1967.*
- Neilands, J.B.: *Studies on lactic dehydrogenase of heart. III. Action of inhibitors. J. Biol. Chem. 208:225, 1954.*
- Park, Y.S. and Hong, S.K.: *Properties of toad skin  $Na^+ - K^+ - ATPase$  with special reference to the effect of temperature. Am. J. Physiol. 231: 1356, 1976.*
- Ponz, F. and Llinas, J.M.: *Essential-SH groups in liver ketohexokinase. Nature 197:696, 1963.*
- Porter, G.A. and Edelman, I.S.: *The action of aldosterone and related corticosteroids on sodium transport across the toad bladder, J. Clin. Invest, 43:611, 1964.*
- Racker, E. and Schroeder, E.A.R.: *The reductive pentose cycle. II. Specific C-1 phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose 1,7-dephosphate. Arch. Biochem. Biophys. 74: 326, 1958.*
- Rao, D.R. and Oesper, P.: *Purification and properties of muscle phosphoglycerate kinase. Biochem. J. 81:405, 1961.*
- Roberts, E. and Rouser, G.: *From Lodin, Z., Janáček, K. and Müller, J. (1964): The localization and effects of mercury bound by the surviving frog skin. J. Cellular, Comp. Physiol. 62:215, 1958.*
- Shamoo, Y.E. and Brodsky, W.A.: *The  $Na^+ - K^+$  dependent ATPase in the isolated mucosal cells of turtle bladder. Biochem. Biophys. Acta, 203:111, 1970.*
- Shamoo, Y.E., Gentile, D.E. and Brodsky, W.A.: *Some properties of the ADP-ATP exchange-reaction in turtle bladder microsomes. Biochem. Biophys. Acta, 203:495, 1970.*
- Sharp, G.W., Komack, C.L. and Leaf, A.: *Studies on the binding of aldosterone in the toad bladder. J. Clin. Invest. 45:450, 1966.*
- Smith, E.L.: *Active site of papain and covalent "high energy" bonds of proteins. J. Biol. Chem. 233:1392, 1958.*
- Srinivasan, P.R., Brunfaut, M. and Errera, M.: *The role of sulfhydryl groups in RNA metabolism. Exptl. Cell. Res. 34:61, 1964.*
- Stoppani, A.O.M. and Brignone, J.A.: *Protection of succinic dehydrogenase thiol groups by fluoride and phosphate. Biochem. J. 64:196, 1956.*
- Strittmatter, P. and Velick, S.F.: *The isolation and properties of microsomal cytochrome. J. Biol. Chem. 221:253, 1956.*
- Tosteson, D.C. and Johnson, J.: *The coupling of*

- potassium transport with metabolism in duck red cells; The effect of sodium fluoride and other metabolic inhibitors. J. Cellular. Comp. Physiol.* 50:169, 1957.
- Ullrich, K.J., Fasold, H., Klöss, S., Rumrich, G., Salzer, M., Sato, K., Simon, B. and de Vries, J.X.: *Effect of SH-, NH<sub>2</sub>-and COOH-site group reagents on the transport processes in the proximal convolution of the rat kidney. Pflügers Arch.* 344:51, 1973.
- Ussing, H.H.: *The alkali metal ions in isolated systems and tissues. Handbk. Exp. Pharmac.* 13:1, 1960.
- Ussing, H.H. and Zerahn, K.: *Active transport of sodium as the source of electric current in the shortcircuited isolated frog skin. Acta Physiol. Scand.* 23:110, 1951.
- Walser, M.: *Calcium transport in the toad bladder: permeability to calcium ions. Am. J. Physiol.* 218:582, 1972.
- Webb, J.L.: *N-ethylmaleimide. In Enzyme and Metabolic Inhibitors. pp 337-365. Academic Press, New York and London, 1966.*
- Weitzel, G. and Schaeg, W.: *Vergleich der hemmeffekte von zink, per-sauerstoff und alkylierungsmitteln gegenüber triosephosphatdehydrogenase und aldolase. Z. Physiol. Chem.* 316:250, 1959.
- Younathan, E.S., Stone, J.E. and Harris, T.S.: *Studies on alloxan: III. Effect on the biosynthesis of uridine nucleotides from uracil. J. Biol. Chem.* 239:290, 1964.
- Zerahn, K.: *Active sodium transport across the isolated frog skin in relation to metabolism. In Membrane transport and Metabolism. (Edited by Kleinzeller, A. and Kotyk, A.) pp 237-246. Academic Press, New York, 1961.*