

# Vanadate 가 가토신피질 Na-K-ATPase 활성에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

우 종 열 · 한 복 기 · 이 상 호

= Abstract =

## Effect of Vanadate on Na-K-ATPase Activity of Rabbit Kidney Cortex

Jong Ryeol Woo, Bok Ki Han and Sang Ho Lee

Department of Physiology, Busan National University, College of Medicine

Studies on the effects of vanadate for Na-K-ATPase activity were carried out with rabbit renal cortex.

1) Na-K-ATPase activity was inhibited with the concentrations of vanadate in incubation medium. The vanadate concentration at which activity was inhibited by 50% (ID<sub>50</sub>) was 10<sup>-6</sup>M and Hill coefficient was 1.00.

2) The fractional inhibition by constant concentration of vanadate decreased with increasing enzyme concentration.

3) Increasing K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations in incubation medium diminished the ability to inhibit Na-K-ATPase by vanadate whereas increasing K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentrations potentiated the inhibition of Na-K-ATPase by vanadate.

4) Vanadate didn't inhibit Na-K-ATPase at pH 6.6. Increasing pH potentiated the inhibition of Na-K-ATPase activity.

5) Vanadate inhibited Na-K-ATPase activity reversibly in all range of concentrations in dilution experiment.

These results show that vanadate inhibits Na-K-ATPase activity with interacting at KE<sub>2</sub> state reversibly.

### 서 론

Vanadium 은 원자량 50.94인 주기율표 5족에 속하는 천연원소로 흙속에 존재하며 사람이 먹는 여러 종류의 식물과 동물에도 존재하는 것으로 알려져 있고<sup>34)</sup> 고등동물의 성장에 필수적인 원소의 하나이다.<sup>17, 29)</sup> Vanadate 는 phosphate 와 유사한 vanadium 의 oxy-anion 유도체이며 장관을 통해 흡수되어 주로 신장으로 배설되며<sup>18, 36)</sup>, 대부분의 포유동물의 조직에는 미량의 vanadium 이 존재하고 신장 특히 피질에서 가장 높은 농도를 나타낸다.<sup>1, 18, 26, 36, 37)</sup>

1975년 Charney 등<sup>11)</sup>이 Sigma 회사 제품의 ATP 에 Na-K-ATPase 의 억제물질이 존재하는 것을 처음 보고

하였고 Beauge 와 Glynn<sup>2)</sup>과 Hudgins 와 Bond<sup>19)</sup>에 의해 이 억제물질은 용액내 K<sup>+</sup>에 의해 Na-K-ATPase 에 대한 억제정도가 증가되는 성질을 가진 것으로 밝혀졌다. 그후 Cantley 등<sup>9)</sup>이 1977년 이 물질이 vanadate 라는 것을 밝혔고 그후 vanadate 의 생물학적작용에 대한 많은 연구들이 이루어졌다.

Vanadate 의 주작용은 신장에서의 수분과 Na<sup>+</sup>의 배설 증가<sup>1, 38)</sup>, 심장의 수축력 증가<sup>16, 35)</sup>, 그리고 평활근의 수축등이다<sup>20, 25)</sup>. Vanadate 는 인공적으로 합성한 원소가 아니고 자연에 존재하는 원소이고 포유류의 생체내에도 정상적으로 존재하므로 생체내에서 Na-K-ATPase 활성도를 조절해 주는 물질일 것으로 기대되며 만성신부전 환자의 혈액에서 vanadate 농도가 증가된다는 것이 보고됨으로써<sup>5)</sup> 만성신부전의 병태생리를

설명하는 데도 이용되고 있다.

따라서 저자는 가토 신장 피질 homogenate에서 세포막의 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 능동적이동에 관여하는 효소인 Na-K-ATPase<sup>12,27,32</sup>에 대한 vanadate의 효과를 관찰하고 정상적인 Na-pump의 작용에 필요한 ligand(즉, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATP, K<sup>+</sup>등)의 영향을 관찰함으로써 vanadate가 생체내에서 Na-pump의 조절에 관여하는지를 추구하고자 본 실험을 시도하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 신피질 homogenate 분리

체중 2~3 kg의 가토를 희생시켜 신피질을 분리한 다음 250 mM sucrose, 40 mM Imidazole buffer(pH 7.5)가 들어있는 병한 용액을 조직 1g 당 20 ml의 비로 넣고 4°C에서 homogenate를 만들어 비결로 된 가아제로 걸러서 0°C의 냉장고에 넣어 보관하였다. Homogenate를 사용하기 전에 상기용액으로 다시 10배 희석하여 사용하였으며 homogenate내 단백질함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry등<sup>23</sup>의 방법으로 측정하였다.

#### Na-K-ATPase 활성도 측정

총 ATPase 활성을 측정하기 위한 표준 incubation 용액의 조성은 100 mM Imidazole-HCl buffer(pH 7.5 at 37°C), 50mM NaCl, 10 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 및 2 mM ATP로 하였고 여기에 0.2 ml의 homogenate를 가하여 총량이 1 ml 되게 하였으며 incubation 용액의 조성 중 K<sup>+</sup>이 없이 0.1 mM ouabain이 존재하는 용액을 blank로 사용하였다. K<sup>+</sup>이 없는 용액을 37°C에서 10분 동안 preincubation 한 후 K<sup>+</sup>을 첨가하여 반응을 시작하였으며 정확히 10분 후 11.67%의 perchloric acid 0.4 ml를 가하여 반응을 정지시켰다.

ATP로부터 가수분해되어 나오는 무기인산의 농도는 Fiske 및 SubbaRow<sup>13</sup>방법으로 측정하였으며 총 ATPase 활성도와 blank와의 차이를 Na-K-ATPase 활성도로 하였다.

Vanadate의 효과를 보는 실험에서는 약물을 preincubation 용액에 첨가하였다.

실험성적은 Student's t-test로 통계처리하였다.

### 실험 성적

#### 1) Vanadate가 Na-K-ATPase 활성에 미치는 영향

Vanadate의 농도를 10<sup>-8</sup>M에서 10<sup>-4</sup>M까지 변화시

키고 Na-K-ATPase의 활성에 대한 약물의 효과를 관찰한 결과 vanadate의 농도에 따라 억제되어 10<sup>-4</sup>M에서 거의 완전히 억제되었고(Fig. 1), vanadate가 없을 때 Na-K-ATPase의 활성도는 2.69±0.12 μmol/Pi/mg protein/10 min 이었고 효소의 활성을 50%억제하는 약물의 농도(I<sub>50</sub>)은 약 10<sup>-6</sup>M이었다. 이 결과를 Hill-plot 한 결과 Hill-coefficient(n)은 1.00이었다.

#### 2) 효소농도에 따른 영향

Fig. 2는 incubation 용액내 vanadate의 농도를 10<sup>-6</sup>M과 5×10<sup>-6</sup>M로 일정하게 유지하고 효소농도에 따른 약물의 억제효과를 관찰한 결과이다. 약물이 존재하지 않을 때 ATP가 가수분해되는 정도는 효소농도에 비례하여 거의 직선적으로 증가하였다. 낮은 효소농도에서는 vanadate가 들어있거나 들어 있지 않거나 효소활성도 곡선을 0점까지 연장시킬 수 있어 vanadate에 의한 억제가 가역적인 작용임을 가르키고 있

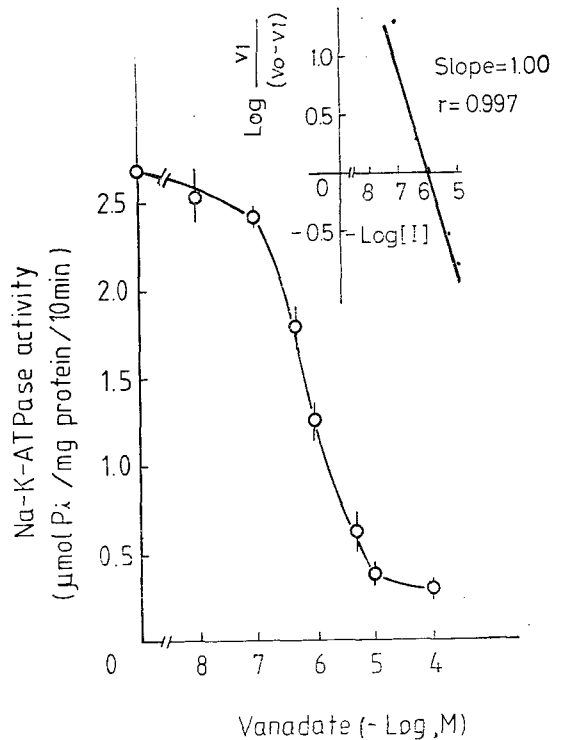


Fig. 1. The effect of varying concentration of vanadate on Na-K-ATPase activities. Each point represents mean±SE of three determinations. Inset shows Hill plot from the same data.

—우종열 외 2인 : Vanadate가 가토신피질 Na-K-ATPase활성에 미치는 영향—

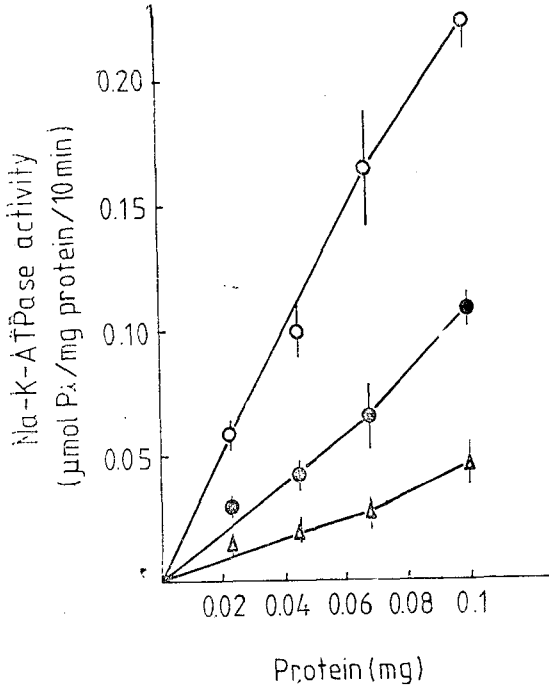


Fig. 2. Rate of ATP hydrolysis as a function of enzyme concentration after 10min preincubation. Assays were performed in standard incubation medium.

○; Control, ●; 10<sup>-6</sup>M vanadate, △; 5×10<sup>-6</sup>M vanadate.

다<sup>30)</sup>. 또한 효소농도가 증가함에 따라 vanadate에 의한 억제정도가 감소하는 결과를 보였다. Vanadate는 혈장에서 단백질등 유기물질과 광범위하게 결합하기 때문에<sup>31)</sup> 이러한 결과는 높은 효소농도에서는 vanadate가 희석됨으로써 효소의 결합부위에 도달하기 어렵기 때문이거나 vanadate가 nonenzymatic low affinity site에 결합하기 때문인 것으로 생각된다.

### 3) Na<sup>+</sup> 농도 변화에 따른 영향

Fig. 3은 vanadate의 Na-K-ATPase 억제 양상에 Na<sup>+</sup>이 어떻게 영향을 미치는지 알기 위하여 incubation 용액 내 K<sup>+</sup>의 농도를 10 mM로 일정하게 유지하고 Na<sup>+</sup>의 농도를 5 mM에서 100 mM까지 변화시키면서 관찰한 결과를 나타낸 것이다. Na<sup>+</sup>농도가 54 mM일때 Na<sup>+</sup>의 activation site가 포화되는 양상을 보였고 Na<sup>+</sup>농도가 증가함에 따라 vanadate의 억제정도가 감소하였다.

### 4) K<sup>+</sup>농도 변화에 따른 영향

Vanadate의 억제 양상에 incubation 용액 내 K<sup>+</sup>이 어떻게 영향을 미치는지 알기 위하여 Na<sup>+</sup>의 농도는

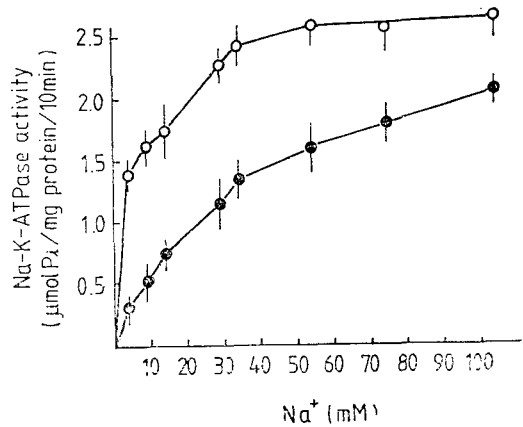


Fig. 3. The effect of Na<sup>+</sup> on vanadate inhibition of Na-K-ATPase. Standard incubation mediums were used, except for increasing concentration of Na<sup>+</sup>.

○; Control, ●; 10<sup>-6</sup>M vanadate.

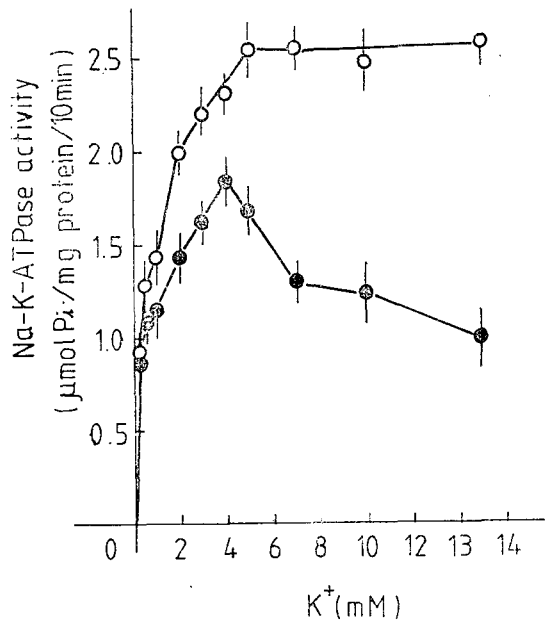


Fig. 4. The effect of K<sup>+</sup> on vanadate inhibition of Na-K-ATPase. K<sup>+</sup> concentration was varied from 0.1 mM to 14 mM while keeping Na<sup>+</sup> concentration constant at 50 mM. Each point represents mean of three determinations.

○; Control, ●; 10<sup>-6</sup>M vanadate. 54 mM로 일정하게 유지하고 K<sup>+</sup>의 농도를 0.1 mM에서 14 mM까지 변화시키면서 관찰한 결과 5 mM K<sup>+</sup>에서 K<sup>+</sup>의 activation site가 포화되는 양상을 보였고 5 mM 이상의 K<sup>+</sup> 농도에서 vanadate의 억제정도가 크게 증가하여 K<sup>+</sup> 농도를 증가시킬 때 따라 억제정도

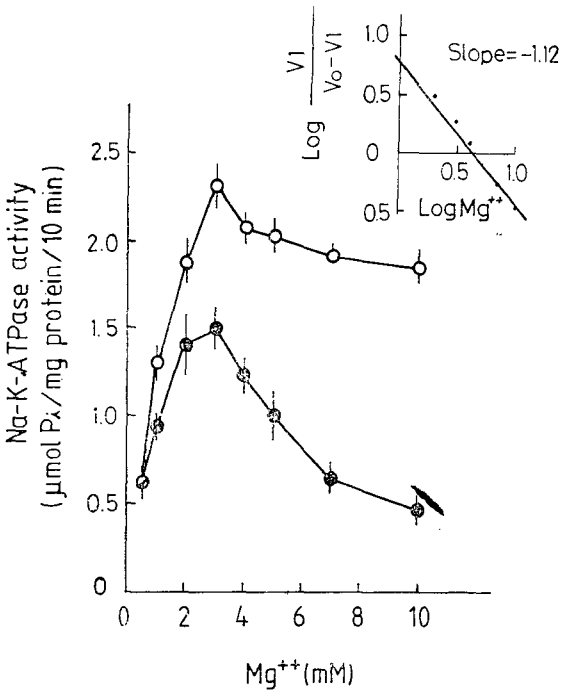


Fig. 5. The effect of  $Mg^{2+}$  on vanadate inhibition of Na-K-ATPase activity. Each point represents mean  $\pm$  SE of three determinations.  $\circ$ ; Control,  $\bullet$ ;  $10^{-6}M$  vanadate. Inset shows Hill plot from the same date.

는 더욱 더 증가하였다(Fig. 4).

5)  $Mg^{2+}$  농도 변화에 의한 영향

Fig. 5는 incubation 용액내 ATP 농도를 2 mM로 일정하게 유지하고  $MgCl_2$ 의 농도를 0.5에서 10 mM까지 변화시켜  $Mg$  농도 변화에 따른 vanadate의 억제정도를 관찰한 성적이다. Vanadate가 없을시 최대활성도는 3 mM  $Mg^{2+}$  농도에서 나타났으며 이보다 높은 농도에서는 억제 현상을 보였다. 이와같은 결과는 free  $Mg^{2+}$ 이  $Mg$ -ATP에 대해 비상경적 억제제<sup>28)</sup>로 작용하기 때문인 것으로 생각된다.  $10^{-6}M$  vanadate 존재시에도 역시 3 mM  $Mg^{2+}$ 에서 최대활성도가 나타났으며  $Mg^{2+}$  농도를 증가시킴에 따라 억제정도가 더욱더 증가하였다. Hill plot 결과 Hill coefficient(n)은 1.12이었다(Fig. 5).

6) ATP 농도 변화에 의한 영향

Fig. 6은 ATP 농도에 따른 Na-K-ATPase 활성에 미치는 vanadate의 효과를 관찰하기 위하여 incubation 용액내 다른 조건은 일정하게 유지하고 ATP 농도를

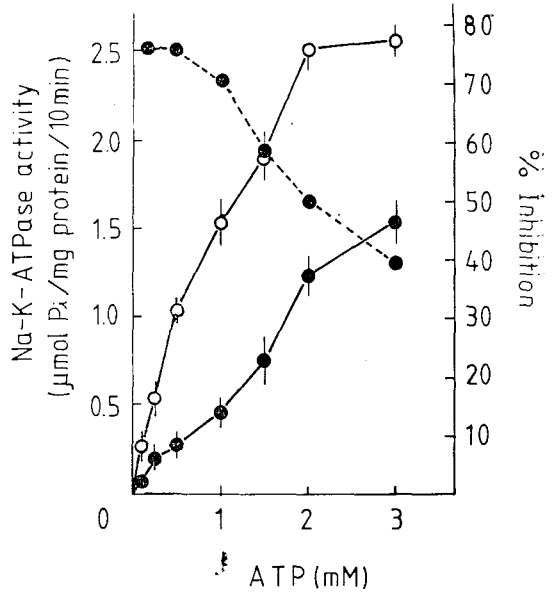


Fig. 6. The effect of total ATP concentration on vanadate inhibition of Na-K-ATPase activity.  $\circ$ ; Control,  $\bullet$ ;  $10^{-6}M$  vanadate.  $\square$ ; Right ordinate, percent inhibition by  $10^{-6}M$  vanadate. Each point represents mean of three determinations.

0.1 mM에서 3 mM까지 변화시켜 관찰한 결과를 나타낸 것이다. ATP 농도가 증가함에 따라 vanadate의 억제정도는 감소하였다(Fig. 6).

7) pH 변화에 의한 영향

Fig. 7은 다른 조건은 일정하게 유지하고 pH를 6.0에서 8.5까지 변화시켜 pH 변화에 따른 vanadate의 억제정도를 관찰한 성적이다. Vanadate가 존재하지 않을 때는 pH 7.5에서 최대활성도를 보였으며 그후 감소하였다. pH 6.0에서는  $10^{-6}M$  vanadate가 효소활도를 억제시키지 못하였으며 pH가 증가함에 따라 그 억제정도가 증가하였다(Fig. 7).

8) Vanadate의 reversibility

효소농도에 따른 실험에서도 이미 시사되었으나 vanadate가 Na-K-ATPase에 가역적으로 작용하는지를 확인하기 위하여 효소를 Table 1처럼 여러농도의 vanadate가 존재하는 용액에서 10분간 preincubation한 후 10 mM KCl을 가하여 10분간 incubation 하였다. 그후 Table 1에 있는 최종농도가 되도록 vanadate

Table 1. Reversibility of vanadate inhibition on Na-K-ATPase activity by dilution

Vanadate	% Control	After dilution % control	Final vanadate concentration after dilution
$5 \times 10^{-7}$	$61.50 \pm 7.07$	$98.12 \pm 10.44$	( $10^{-7}$ M)
$10^{-6}$	$47.50 \pm 4.80$	$71.15 \pm 6.77$	( $5 \times 10^{-7}$ M)
$5 \times 10^{-6}$	$28.64 \pm 3.00$	$40.52 \pm 2.18$	( $10^{-6}$ M)

These values represent mean  $\pm$  SEM of three experiments.

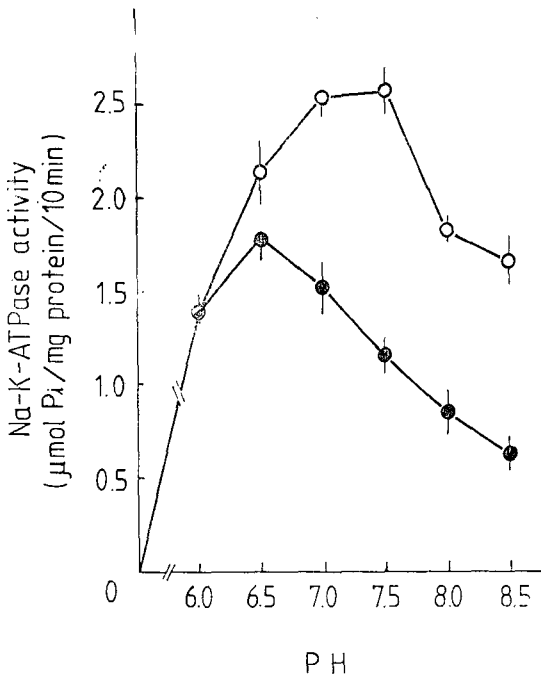


Fig. 7. The effect of pH on inhibition of Na-K-ATPase in the presence of vanadate. Various pH was obtained using mixture of imidazole/Tris-HCl buffers. Each point represents mean  $\pm$  SE from three determinations.  
○; Control, ●;  $10^{-6}$ M vanadate.

는 없고 같은 농도의 ATP를 가진 incubation 용액을 가하여 회석하여 다시 10분간 incubation 하였다. Vanadate가 없는 용액으로 위와같은 처리를 하여 대조값을 얻어 대조값에 대한 비로 실험결과를 나타내었다.

모든 농도에서 vanadate는 Na-K-ATPase를 가역적으로 억제하여 회석후의 억제정도는 회석하지 않은 같은 농도에서의 억제정도와 통계적으로 유의적인 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

## 고찰

Cantley 등<sup>9)</sup>에 의해 Na-K-ATPase의 강력한 억제 물질로 알려진 vanadate는 포유류의 성장에 필수적인 vanadium의 oxyanion 유도체이며 육류를 통해 정상적으로 섭취되어 주로 소변을 통해 배설된다<sup>18,36)</sup>. 실험동물에서 정맥내 vanadate 주입시 수분과 Na<sup>+</sup>의 배설이 현저히 증가되며 이러한 작용은 근위세뇨관에서 Na-pump의 억제를 통해 일어나는 것으로 보고되었다<sup>1,38)</sup>. 또한 토끼와 개의 신장에서는 Sigma ATP가 만들어지는 말의 골격근에 비해 2배 정도의 vanadate를 포함하고 있는 것으로 알려졌다<sup>21)</sup>.

본 실험결과 vanadate는  $10^{-8}$ M에서  $10^{-4}$ M 범위에서 신피질의 Na-K-ATPase를 농도에 비례하여 억제하였고  $I_{50}$ 은  $10^{-6}$ M이었다(Table 1). 이러한 결과는 Nieder 등<sup>24)</sup>이 사람의 신장에서 보고한 결과와 일치하나 Cantley 등<sup>9)</sup>과 Grantham과 Glynn<sup>15)</sup>의 결과보다는 다소 높았다. 이것은 사용된 incubation 용액의 조성 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

또한 Hill plot 결과 Hill coefficient가 1.00을 나타냄으로써 vanadate의 binding site가 1개임을 시사해 주며 이러한 결과는 Bond와 Hudgins의 결과와 일치하였다<sup>6)</sup>.

여러 저자들이<sup>3,9,10)</sup> Na-K-ATPase에 대한 vanadate의 생리적 조절가능성을 시사해왔다. Vanadate가 Na-pump의 조절물질로 작용하기 위한 중요한 특징은 가역성이다.

본 실험에서 dilution과 단백질 농도에 따른 실험으로 vanadate가 가역적으로 작용함을 알 수 있고(Fig. 2, Table 1) vanadate와 Na-K-ATPase의 결합은 다소 느슨한 복합체를 형성함을 짐작할 수 있다. 또한 vanadate의 억제작용이 incubation 용액내 K<sup>+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>의 증가와 Na<sup>+</sup>과 ATP의 감소에 의해 증가됨으로써 vanadate의 Na-K-ATPase에 대한 결합이 매우 복

잡한 조절을 받는다는 것을 알 수 있다.  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 이 어떻게 vanadate의 결합에 영향을 미치는지는 확실하지 않으나 Smith 등<sup>33)</sup>은 개 신장에서 incubation 용액 내  $\text{Na}^+$ 의 농도를 증가시키면 효소에 결합된 vanadate의 해리속도가 크게 증가한다고 보고하였고 Bond와 Hudgins<sup>6)</sup>는  $\text{Na}^+$ 이 vanadate의 결합을 증가시키는  $\text{K}^+$ 과 경쟁적으로 작용하거나  $\text{Na}^+$ 이 결합함으로써 vanadate 결합의 친화력이 감소된다고 주장하였다.

본 실험에서  $\text{K}^+$ 의 억제작용은 Na-K-ATPase의 탈인산화를 증가시키는  $\text{K}^+$ 의 km 값보다 높은 농도에서 현저히 나타났고 이것은 세포외측에서  $\text{K}^+$ 이 Na-K-ATPase 활성을 증가시키는 부위보다 친화력이 낮은  $\text{K}^+$ 의 결합부위를 통해  $\text{K}^+$ 이 vanadate의 억제작용을 증가시킨다는 것을 시사한다.  $\text{K}^+$ 의 이 결합부위는 p-nitrophenyl phosphatase 활성과 beryllium과 fluoride에 의한 Na-K-ATPase의 억제에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 또한 Na-K-ATPase에 대한 vanadate의 억제정도가  $\text{Na}^+$ 농도 증가에 의해 감소되고  $\text{K}^+$ 의 농도 증가에 의해 증가되므로 vanadate는 Na-K-ATPase의 dephosphorylated form에 결합하는 것으로 생각된다. Beauge와 Glynn<sup>3)</sup>이 지적한대로 vanadate에 의한 억제가 정상 농도를 포함한 세포외액의  $\text{K}^+$  농도에 매우 민감하다는 것은 극소적인 세포외액의  $\text{K}^+$  농도의 변화가 vanadate를 함유한 세포에서  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  이동을 조절하는데 중요한 요소일 가능성을 시사한다고 하겠다.

$\text{Mg}^{2+}$ 이 vanadate의 억제작용을 증가시키는 것은 세포내부의 결합부위에 작용함으로써 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>4, 6, 22)</sup>.

본 실험에서도  $\text{Mg}^{2+}$ 의 증가가 vanadate의 억제작용을 증가시켰고 Hill plot 결과 Hill coefficient가 1.12로서 vanadate와 같이 결합부위가 하나라는 것을 암시해준다.

ATP 농도 증가시 vanadate의 억제작용이 감소함으로써 ATP와 vanadate가 같은 site에 경쟁적으로 작용하는 것으로 생각될 수 있으나 Smith 등<sup>33)</sup>은 vanadate가 결합한 효소에 ATP가 결합하지 못한다고 하였으며 Wierichs 등<sup>39)</sup>은 ATP가  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에 대한 vanadate의 억제작용을 감소시키나  $\text{Mg}^{2+}$ 과 ATP 농도 비를 1 : 1로 일정하게 유지시키면서 ATP 농도를 변화시킨 결과 ATP가 vanadate의 억제작용에 영향을 미치지 못한다고 하였고 Nieder 등<sup>24)</sup>도 신장의  $\text{K}^+$ -dependent phosphatase에서 vanadate가 ATP에 대해 비경쟁적 억제양상을 보인다고 함으로써 ATP의 이같은

작용은 용액내 free  $\text{Mg}^{2+}$ 의 농도를 변화시키므로써 나타난 것으로 생각된다. pH의 효과를 관찰한 실험에서 pH 6.0에서 vanadate는 Na-K-ATPase를 억제시키지 못하였고 pH가 증가함에 따라 억제정도가 증가하였다. 이러한 결과는 Singh 등<sup>31)</sup>의 glucose-6-phosphatase에서 관찰한 결과와 일치한다. Vanadate는 생체내에서 2가지 산화형태를 가지며 vanadate( $5^+$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ )가 vanadyl( $4^+$ ,  $\text{VO}_2^+$ )보다 Na-K-ATPase에 대한 더욱 더 강력한 억제제이다<sup>8, 15)</sup>. 따라서 이러한 결과는 pH에 의해 vanadate의 산화상태와 중합화정도가 영향을 받아 Na-K-ATPase에 대한 억제능력이 감소되어 나타나는 것으로 설명될 수 있으며 한편 pH의 변화가 효소 자체의 결합부위에 변화를 초래하여 생기는 것으로도 생각할 수 있으나 본 연구로서는 확인하기 어렵다 하겠다.

이상의 결과로 보아 생체내에서 vanadate의 Na-pump에 대한 조절은 총 vanadium의 농도, 단백질과의 결합비율, 산화환원상태, 그리고 세포외부의  $\text{K}^+$ 의 농도에 의해 영향을 받을 것으로 사료된다.

## 결 론

Vanadate가 가토신피질의 Na-K-ATPase 활성에 미치는 효과를 관찰하여 그 작용기전을 구명한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 가토신피질내 Na-K-ATPase 활성은 vanadate에 의해 농도에 따라 억제되었으며 효소활성을 50%억제하는 농도는  $10^{-6}\text{M}$ 이었고 Hill coefficient는 1.00이었다.

2) 효소농도가 증가함에 따라 vanadate의 억제정도가 감소하였고 vanadate를 희석시킨 실험에서도 vanadate의 억제정도가 희석하지 않은 같은 농도에서의 억제정도와 같아 가역적 저지현상을 보였다.

3) Incubation 용액내  $\text{Na}^+$ 과 ATP를 증가시킬 때 억제정도는 감소하였고  $\text{K}^+$ 과  $\text{Mg}^{2+}$ 의 농도를 증가시킬 때 억제정도는 증가하였다.

4) Vanadate의 Na-K-ATPase에 대한 억제정도는 낮은 pH에서는 감소하였고 pH가 증가할수록 억제정도가 증가하였다.

이상의 결과로 보아 vanadate는 phosphate와 유사 물질로 Na-K-ATPase의 반응중  $\text{KE}_2$  상태에 가역적으로 결합하여 효소의 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Balfour, W.E., Grantham, J.J. and Glynn, I.M.: *Vanadate-stimulated natriuresis in the rat. Nature (London)*, 275:768, 1978.
- 2) Beauge, L. and Glynn, I.M.: *A modifier of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase in commercial ATP. Nature (London)*, 268:355, 1977.
- 3) Beauge, L.A. and Glynn, I.M.: *Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase to external potassium. Nature(London)*, 272:551, 1982.
- 4) Beauge, L.A., Cavieres, J.D., Glynn, I.M. and Grantham, J.J.: *The effects of vanadate on the fluxes of sodium and potassium ions through sodium pump. J. Physiol.*, 301:7, 1980.
- 5) Bello-Reuss, E.M., Grady, T.P. and Mazumdar, D.C.: *Serum vanadate levels in chronic renal disease. Ann. Intern. Med.*, 91:743, 1979.
- 6) Bond, G.H. and Hudgins, P.M.: *Kinetics of inhibition of Na-K-ATPase by Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and vanadate. Biochem.*, 18(2):325, 1979.
- 7) Campbell, R.F. and Chasteen, N.D.: *An anion binding study of vanadyl(IV) human serotransferrin. J. Biol. Chem.*, 252:5996, 1977.
- 8) Cantley, L.C. and Aisen, P.: *The fate of cytoplasmic vanadium. J. Biol. Chem.*, 254:1781, 1979.
- 9) Cantley, L.C., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C. and Guidotti, G.: *Vanadate is a potent (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>) ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J. Biol. Chem.*, 252:7421, 1977.
- 10) Cantley, L.C. Jr., Resh, M.D., and Guidotti, G.: *Vanadate inhibits the red cell (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase from the cytoplasmic side. Nature (London)*, 272:552, 1978.
- 11) Charney, A.N., Silva, P. and Epstein, F.H.: *An in vitro inhibitor of Na-K-ATPase present in an adenosine triphosphate preparation. J. Appl. Physiol.*, 39:156, 1975.
- 12) Dunham, E.T. and Glynn, I.M.: *Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol.*, 156:274, 1961.
- 13) Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- 14) Glynn, I.M. and Karlisch, S.J.D.: *The sodium pump. Annu. Rev. Physiol.*, 37:13, 1975.
- 15) Grantham, J.J. and Glynn, I.M.: *Renal Na-K-ATPase determinants of inhibition by vanadium. Am. J. Physiol.*, 236(6):F530, 1979.
- 16) Hackbarth, I., Schmitz, W., Scholz, H., Erdmann, E., Kravietz, W., and Phyllipp, G.: *Positive inotropism of vanadate in rat papillary muscle. Nature(London)*, 275:67, 1978.
- 17) Hopkins, L.L. Jr.: *Essentiality and junction of vanadium. In: Trace element metabolism in animals, edited by Hokstra, W.G., Suttie, J.W., Ganther, H.E. and Merty, W. Baltimore: Univ. Park, 1974, vol.2, p,397-406.*
- 18) Hopkins, L.L. and Tilton, B.E.: *Metabolism of trace amounts of vanadium-48 in rat organs and liver subcellular particles. Am. J. Physiol.*, 211:169, 1966.
- 19) Hudgins, P.M. and Bond, G.H.: *(Mg<sup>2+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent inhibition of Na, K-ATPase due to a contaminant in equine muscle ATP. Biochem. Biophys. Res. Commun*, 77:1024, 1977.
- 20) Hudgins, P.M. and Bond, G.H.: *Alterations by vanadate of contractility in vascular and intestinal smooth muscle preparations. Pharmacol.*, 23:156, 1981.
- 21) Jørgensen, P.L.: *Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. Physiol. Rev.*, 60(3):864, 1980.
- 22) Karlisch, S.J.D., Beauge, L.A. and Glynn, I.M.: *Vanadate inhibits (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated pump. Nature(London)*, 282:333, 1979.
- 23) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rendall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.

- 24) Nieder, G.L., Corder, C.N. and Culp, P.A.: *The effect of vanadate on human kidney potassium dependent phosphatase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.*, 307:191, 1979.
- 25) Ozaki, H., Ueda, F. and Urakawa, N.: *Inhibitory effects of vanadate on the contractile response in vascular smooth muscle. Eur. J. Pharmacol.*, 80:317, 1980.
- 26) Parker, R.D.R. and Sharma, R.P.: *Accumulation and depletion of vanadium in selected tissues of rats treated with vanadyl sulfate and sodium orthovanadate. J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 2:235, 1978.
- 27) Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem.*, 235:1796, 1960.
- 28) Robinson, J.D.: *Nucleotide and divalent cation interactions with the (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-dependent ATPase. Biochim. Biophys. Acta*, 341:232, 1974.
- 29) Schwarz, K. and Miline, D.B.: *Growth effects of vanadium in the rat. Science*, 174:426, 1971.
- 30) Segel, I.H.: *Enzyme kinetics. New York, John Wiley*, 1975.
- 31) Singh, J., Nordlie, R.C. and Jorgenson, R.A.: *Vanadate a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. Biochim. Biophys. Acta*, 678:477, 1981.
- 32) Skou, J.C.: *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta*, 23:394, 1957.
- 33) Smith, R.L., Zinn, K. and Cantley, L.C.: *A study of the vanadate trapped state of the (Na, K)-ATPase. J. Biol. Chem.*, 255(20): 9852, 1980.
- 34) Smöremark, R.: *Vanadium in some biological specimens. J. Nutr.*, 92:394, 1967.
- 35) Takeda, K., Temma, K. and Akera, T.: *Inotropic effects of vanadate in isolated rat and guinea-pig heart under conditions which modify calcium pools involved in contractile activation. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 222(1):132, 1982.
- 36) Talvitie, N.A. and Wagner, W.D.: *Studies in vanadium toxicity. II. Distribution and excretion of vanadium in animals. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 9:414, 1954.
- 37) Valberg, L.S. and Holt, J.M.: *Detection of vanadium in normal human erythrocytes. Life Sci.*, 3:1263, 1964.
- 38) Westenfelder, O., Hamburger, R.K. and Garcia, M.E.: *Effect of vanadate on renal tubular function in rats. Am. J. Physiol.* 240:F522, 1981.
- 39) Wierichs, R., Hagenmeyer, and Bader, H.: *Influence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the vanadate inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from pig heart sarco plasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 92(4):1124, 1980.