

가토 신피질 절편에서 PAH(*p*-aminohippuric acid) 이동에 미치는 음이온의 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

서 덕 준 · 이 상 호

서울대학교 의과대학 생리학교실

성 호 경

=Abstract=

Effects of Anions on PAH Transport in Rabbit Kidney Cortical Slices

Duk Joon Suh and Sang Ho Lee

Department of Physiology, Pusan National University, College of Medicine

Ho Kyung Sung

Department of Physiology, Seoul National University, College of Medicine

The effects of anions on net accumulation of *p*-aminohippurate(PAH) were studied in rabbit kidney cortical slices. Experiments were carried while varying the major anionic composition of the incubation medium(replacement of Cl⁻ by isethionate and SCN⁻). The total replacement of Cl⁻ with isethionate, SO₄²⁻ and SCN⁻ in the incubation medium decreased the 60-min slice-to-medium concentration(S/M) ratio of PAH to 60%, 40% and 50% of control value, respectively. The degree of inhibition in PAH accumulation by the replacement of isethionate and SCN⁻ was increased with increasing of both preincubation and incubation time. The influence of isethionate and SCN⁻ on PAH uptake was fully reversible. Both isethionate and SCN⁻ increased the apparent Km value significantly with no change on the apparent Vmax value, suggesting a competitive inhibition on PAH uptake. And the inhibitory effect of SCN⁻ on PAH uptake decreased with increase of pH in the incubation medium while that of isethionate increased with increase of pH. Intracellular water content, intracellular electrolyte concentration and oxygen consumption were not influenced by the replacement of Cl⁻ with isethionate or SCN⁻ in the incubation medium. These results suggest that both isethionate⁻ and SCN⁻ inhibit the PAH uptake by binding to some site necessary for normal PAH transport without affecting the cellular viability.

서 론

신장은 체액내의 불필요한 물질을 체외로 제거하고

체액의 조성을 일정하게 유지시키는데 필요한 장기이다. 신장이 이러한 기능을 수행하기 위하여 우선 신장으로 들어온 혈장의 20% 가량을 사구체에서 여과한 후 여과된 액체 중에서 체내에 필요한 물질만 세뇨관에서

재흡수하고 나머지를 요증으로 배설한다. 사구체에서 여과되지 않은, 혈장내에 포함되어 있는 불필요한 물질은 혈액이 세뇨관 주위를 흐를 때 세뇨관 세포에 의하여 요증으로 분비된다. 이 세뇨관 분비에는 각종 유기물의 분비가 있는데 이들 분비 경로는 크게 두가지 즉, 유기산제통(혹은 hippurate system)(Sperber, 1959)과 유기염기계통(Peters, 1960)으로 구분되는데 전자의 경우 대부분의 약유기산이 이에 속한다. 이러한 약유기산 중 가장 광범위하게 연구된 것으로는 phenolsulfonphthalein(PSP)계 색소들과 sulfonic acid, sulfonamide, para-aminohippuric acid(PAH) 및 기타 hippurates, benzoates, probenecid 그리고 heterocyclic carboxylic acid 계에 속하는 diodrast 및 penicillin 등이 있다.

신세뇨관을 통한 이러한 유기산들의 분비과정은 일찌기 1951년 Rowntree 및 Geraghty에 의하여 PSP가 신장기능 조사에 도입된 이래 여러 동물에서 연구되었는데, 그 분비기전의 특성은 대사에너지를 필요로 하는 능동적 과정이며(Chambers et al., 1935; Cross and Taggart, 1950; Forster and Taggart, 1950; Forster and Copenhaver, 1956; Mudge and Taggart, 1950; Rennick and Farah, 1956; Shideman et al., 1952; Taggart and Forster, 1950) 최대분비능(Tm)을 나타내고 있음(Cho et al., 1960; Forster and Hong, 1962; Shannon, 1935; Smith et al., 1945)이 증명되고 있다. 이처럼 최대분비능을 보이는 것은 신세뇨관을 통한 이들 물질의 이동이 세뇨관 세포내에 존재하는 일정한 수의 운반체에 의하여 운반되기 때문이다(Taggart, 1958). 그런데 이러한 유기산의 능동적 분비 부위가 근위세뇨관임을 직접 현미경을 통한 색소이동 관찰(Forster and Copenhaver, 1956)이나 stop flow 연구(Foulkes and Miller, 1959; Malvin et al., 1958)로서 증명되고 있는 바, 근위세뇨관의 대부분을 포함하고 있는 피질층의 절편을 사용함으로써 유기산분비에 대한 여러가지 화학적 내지 물리학적 요인의 영향을 직접적으로 추구할 수 있을 뿐만 아니라 대사활동의 교란, 촉진 그리고 특정한 물질이동에 특수하게 작용하는 물질의 영향들을 연구함으로써 분비과정 본체를 구명함에 있어서 많은 진척을 가져왔다.

신세뇨관을 통하여 PAH가 분비될 때 최대분비를 위하여는 Na⁺과 K⁺등 양이온을 필요로 하며(Forster and Copenhaver, 1956; Podevin and Boumendil-Podevin, 1977; Taggart et al., 1953), 신피질 절편을 통한 PAH 이동에서도 Na⁺이 주요한 역할을 하는

것으로 밝혀져 있다(Chung et al., 1970). 하지만 음이온이 신세뇨관에서 PAH 이동에 미치는 영향에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있다.

Dantzier 및 Bentley(1981)는 뱀의 분리된 신세뇨관을 이용한 실험(isolated perfused renal tubule method)에서 관류액중 Cl⁻대신에 thiocyanate(SCN⁻)로 대체하면 PAH 분비는 상당히 억제된다고 하였으며, 이 PAH 이동에 대한 효과는 단지 상피세포막 내외의 전위차 변화로 인한 결과는 아니며, PAH 이동단계가 관여한다고 하였다.

Berner와 Kinne(1976)는 가토 신피질에서 분리한 소포체(vesicle)에서의 PAH 이동시 brush border를 통한 이동은 단순 확산기전이 관여하는데 반하여 basolateral membrane에서는 probenecid에 의하여 상경적으로 억제되는 특이한 이동체가 관여하고 있으며, 이 기전은 막전압의 변동에 의하여 영향을 받는다고 하였다. 즉 Cl⁻대신 SO₄²⁻로 처리하여 소포체 내부를 양성쪽으로 변화시키면 PAH 이동은 증가되며 Cl⁻대신 SCN⁻로 대체하여 소포체 내부를 음성쪽으로 변화시키면 PAH 이동은 감소된다고 하였다. 그러나 이들은 단지 소포체내 막전위를 변화시키기 위하여 Cl⁻대신 다른 음이온을 사용했을 뿐 무기음이온 자체의 효과에 대해서는 관찰하지 않았다.

최근 인체 적혈구 세포막에서 음이온이동 기전은 두가지 기전이 관여한다고 알려져 있으며 두가지 음이온 운반체가 가정되었다(Halestrap, 1976). 즉 하나는 Cl⁻운반체로서 이는 무기 음이온(예 : Cl⁻, HCO₃⁻ 및 SO₄²⁻)에 대하여서는 친화성이 높으나 유기 음이온(예 : carboxylates, pyruvate, lactate)에 대하여서는 친화성이 낮은 운반체이며, 또 다른 운반체는 유기 음이온에 대하여 친화성이 높은 Cl⁻ 비의존성 운반체이다. 전자의 운반체는 단지 후자의 운반기전이 억제될 때 유기 음이온을 이동시킨다. 더우기 소의 적혈구 세포막 실험에서 PAH가 이동될 때 음이온으로써 이동되며(Albert and Matais, 1975), HCO₃⁻, Cl⁻, pyruvate와 oxalate는 probenecid에 의하여 억제된다고 보고되었다. 이런 실험상의 결과를 토대로 Motais와 Cousin(1976)은 probenecid가 신장에서 유기 음이온을 억제하는 기전은 적혈구에서의 기전과 동일할 것이라고 추측하였다. 따라서 신피질에서 PAH 이동시 무기 음이온에 의해 영향을 받을 가능성이 있다. 그러므로 세포막 지질층을 잘 통과하는 음이온과 잘 통과하지 못하는 음이온들에 의해 PAH 이동이 어떻게 영향을 받는지에 대해서는 매우 흥미로운 것으로 생각된

다. 단지 Taggart 등(1953)이 신피질 절편에서 용액 내 lyotropic anion 들의 농도를 변화시켰을 때 PAH 이동이 감소된다는 보고는 하였으나 그 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 최근에 Hong 등(1978)은 적혈구 막에서 음이온의 이동을 억제하는 것으로 밝혀진 (Cabantchick and Rothstein, 1972; Rothstein et al., 1976; Snow et al., 1981), SITS(4-acetamide-4'-isothiocyano-stilbene-2, 2'-disulfonic acid)가 신피질 절편에서 PAH 이동을 상경적으로 억제하는데 그 억제 기전은 PAH 결합 부위에서 amino 기와 정전기적(electrostatically)으로 결합하여 그 효과를 나타내는 것으로 밝혔으며, 또한 lyotropic anion 들이 amino 기와 반응한다는 사실이 밝혀졌기 때문에(Wieth, 1970) 무기 음이온들의 이와같은 특성이 PAH 이동을 억제할 가능성이 있다.

따라서 저자는 세포막을 잘 통과하는 무기 음이온과 잘 통과하지 못하는 무기 음이온의 변화가 PAH 이동에 어떤 영향을 미치며 그 기전은 어떠한지를 구명하기 위하여, 세포막을 잘 통과하는 것으로 알려진 SCN⁻과 잘 통과하지 못하는 것으로 밝혀진 isethionate (2-hydroxyethanesulfonic acid; C₂H₆O₄S) 및 SO₄²⁻를 Cl⁻대신 바꾼 후 PAH 이동에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법 및 실험재료

1) 신절편 제작 및 Incubation 과정

체중 2~3 kg의 가토를 암수 구별없이 사용하였다. 가토의 두부를 타격하여 질식시킨 후 콩팥을 적출하여 피막을 벗기고 미리 산소를 공급하면서 약 2°C로 냉각시켜 둔 냉한 용액(0.13 M NaCl-0.02 M KCl)(Copenhagen and Forster, 1958)에 넣은 다음 혈액을 제거하기 위하여 콩팥을 위의 용액 30~40 ml로 관류시

켰다. 신절편은 Staddie-Riggs microtome 으로 0.3~0.5 mm 두께로 제작하여 10 ml의 preincubation 용액이 들어있는 flask 속에 2~3개(약 100 mg)의 신절편을 넣어 incubation 하였다. Incubation 용액의 기본 조성은 표 1과 같으며 28°C에서 pH는 7.6으로 맞추었으며, 여기에 74 μM PAH를 가한 후 100% 산소 공급하에서 행하였다. Preincubation은 incubation 용액에서 PAH를 제거한 용액을 사용하였다.

2) PAH 및 Inulin 측정

Incubation이 끝난 후 절편을 꺼집어 내어 가아제 및 여과지로서 절편 주위의 수분을 제거하고 무게를 잰 후 절편내 축적된 PAH 양은 1 ml 증류수로서 homogenize한 후 Smith 등의 방법(1945)으로 측정하였다. 용액내의 PAH 농도도 동일한 방법으로 측정하여 조직내 축적된 정도는 절편조직내 PAH 농도(S; mM/kg wet wt./hr)에 대한 용액내 PAH 농도(M)의 비 즉 S/M 비로서 나타내었다. 능동적으로 축적된 PAH 양은 총 축적된 양에서 수동적으로 축적된 양의 차이로서 계산하였고 수동적으로 축적된 PAH 양은 600 μM probenecid 존재 하에서 측정하였다. 또한 inulin은 homogenize한 후 Schreiner 방법(1950)으로 측정하였다.

3) 세포내 수분함량 및 세포내 Na⁺, K⁺농도 측정

Incubation이 끝난 후 절편을 꺼집어 내어 가아제 및 여과지로서 절편 주위 수분을 제거하고 무게를 잰 후 dry oven에서 95°C를 유지시키면서 하루를 지낸 후 무게를 재어 세포내 수분 함량을 계산하였다. 건조된 조직을 진한 질산에 담구어 48시간이 지난 후 Beckman klinea flame photometer로서 세포내 Na⁺ 및 K⁺농도를 측정하였다.

Table 1. Composition of incubation media(mM). Incubation was carried while varying the major anionic composition of the incubation medium(replacement of Cl⁻ by isethionate or SCN⁻)

Anion	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Na-acetate	Phosphate buffer
Cl ⁻	NaCl(100)	KCl(40)	CaCl ₂ (1.5)	5	5
Isethionate	Sodium isethionate (100)	K ₂ SO ₄ (20)	CaSO ₄ (1.5)	5	5
SCN ⁻	Sodium thiocyanate (100)	K ₂ SO ₄ (20)	CaSO ₄ (1.5)	5	5

Table 2. Slice-to-medium concentration(S/M) ratio of PAH in the presence of varying concentrations of isethionate, SCN⁻ and SO₄²⁻ as replacement for Cl⁻ in incubation media. Results shown are means±S.E. for 5 experiments. Data were analyzed using the unpaired Student's t-test and probabilities shown are comparison to the 0% substitute values. Numbers of parentheses indicate % S/M ratio compared with controls.

Substitution(%)	Isethionate	SCN ⁻	SO ₄ ²⁻
0	6.92+0.62 (100.00)	6.92+0.62 (100.00)	6.92+0.62 (100.00)
25	6.92+0.48 (100.00)	6.99+0.97 (101.01)	6.02+0.44 (87.02)
50	6.50+0.31 (93.93)	4.93+0.54** (71.24)	4.22+0.42** (60.90)
75	5.78+0.44* (83.53)	4.41+0.70** (63.73)	3.47+0.35** (50.14)
100	4.09+0.37** (59.10)	3.28+0.25** (47.40)	2.84+0.21** (41.04)

(* , p<0.05; ** , p<0.01, statistically significant)

4. 조직의 산소 소모량 측정

신피질 절편내 산소 소모량은 Clark-type 의 산소 전극(YSI model 53)을 사용하여 25°C에서 밀폐된 incubation 용기내에 신피질(약 100 mg)을 4 ml 의 incubation 용액내에서 15분간 산소분압의 감소로서 측정하였다(μl O₂/hr/mg wet tissue).

실 험 성 적

PAH 이동에 영향을 미치는 여러인자들의 효과를 인자별로 보면 아래와 같다.

1) PAH 이동에 대한 음이온의 효과

신피질 절편에서 유기산인 PAH 이동에 대한 isethionate, SCN⁻ 및 SO₄²⁻ 효과를 관찰하기 위하여 incubation 용액중 Cl⁻ 대신 isethionate, SCN⁻ 및 SO₄²⁻ 으로서 대치시켜 preincubation 30분 후 incubation 을 60분으로 실험한 결과(표 2 및 그림 1) 대치가 많이 되면 월수록 PAH 이동은 감소하여 Cl⁻ 대신 세포막을 잘 통과하지 못하는 isethionete 을 100%대치시키면 PAH 의 S/M 비가 6.92에서 4.09로(<0.01) 약 60%, SO₄²⁻에서는 2.84로(p<0.01) 약 40%로 감소되었으며. 세포막을 잘 통과하는 SCN⁻에서는 3.28로(p<0.01) 약 50%로 감소되었다.

2) Preincubation 시간에 따른 효과

표 3은 Cl⁻ 대신에 isethionate 및 SCN⁻을 100% 대치시킨 용액에서 신피질절편을 preincubation 할 때 시간에 따른 PAH 의 이동변화를 60분간 incubation 해 본 결과, isethionate- 경우에는 30분까지 preincu-

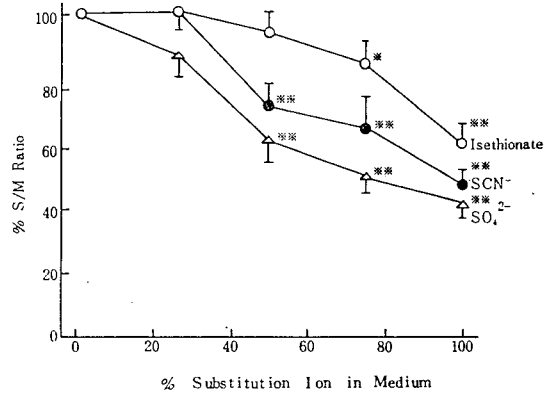


Fig. 1. Slice-to-medium concentration(S/M) ratio of PAH in the presence of varying concentrations of isethionate, SO₄²⁻ and SCN⁻ as replacement for Cl⁻ in incubation media. Data were analyzed using the unpaired Student's t-test and probabilities shown are comparison to the 0% substitute values. Ordinate indicates % S/M ratio and abscissa indicates % substitution ion in medium.

(* , p<0.05; ** , p<0.01, statistically significant)

ation 시간이 길어짐에 따라 억제정도가 증가하는 경향을 보였으며, SCN⁻ 경우에는 60분까지 억제정도가 증가하는 경향을 보였다. 이후 모든 실험에서는 preincubation 을 30분으로 하였다.

3) Incubation 시간에 따른 효과

신피질 절편에서 PAH 이동을 억제하는 isethionate 및 SCN⁻의 효과가 incubation 시간에 따라 어떻게 영향을 받는지를 관찰하기 위하여 Cl⁻ 대신에 isethio-

—서덕준 외 2인 : 가토 신피질 절편에서 PAH(*p*-aminohippuric acid) 이동에 미치는 음이온의 영향—

Table 3. Effect of isethionate and SCN^- on PAH uptake(S/M ratio) in rabbit kidney cortical slices as a function of preincubation time. All values represent means \pm S.E. of 6 experiments. Numbers in parentheses indicate % S/M ratio compared with controls.

Anion Time	Cl^- (Control)	Isethionate	SCN^-
0	5.95 \pm 0.63	3.63 \pm 0.44(60.84)	2.95 \pm 0.25(49.58)
10	5.96 \pm 0.62	3.17 \pm 0.31(53.19)	2.81 \pm 0.21(47.15)
30	6.80 \pm 0.51	3.14 \pm 0.35(46.18)	2.75 \pm 0.18(40.44)
60	6.85 \pm 0.48	3.32 \pm 0.52(48.47)	2.20 \pm 0.27(32.12)

Table 4. Effect of isethionate and SCN^- on PAH uptake(S/M ratio) in rabbit kidney cortical slices as a function of incubation time. All values represent means \pm S.E. of 6 experiments. Numbers of parentheses indicate % S/M ratio compared with controls.

Anion Time	Cl^- (Control)	Isethionate	SCN^-
8	1.96 \pm 0.15	1.24 \pm 0.09(63.27)	1.20 \pm 0.20(61.22)
15	2.88 \pm 0.32	1.92 \pm 0.19(66.67)	1.72 \pm 0.26(59.38)
30	4.20 \pm 0.60	2.29 \pm 0.18(54.52)	2.09 \pm 0.21(49.76)
45	5.60 \pm 0.91	3.10 \pm 0.24(55.36)	2.13 \pm 0.36(44.64)
60	7.10 \pm 1.00	3.33 \pm 0.23(46.90)	3.08 \pm 0.28(43.38)
120	7.48 \pm 1.28	3.71 \pm 0.09(49.60)	3.01 \pm 0.27(40.24)

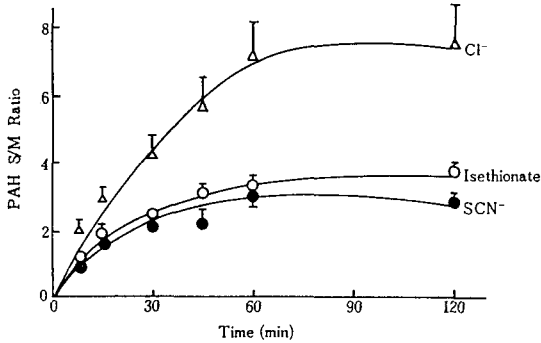


Fig. 2. Effect of isethionate and SCN^- on PAH uptake in rabbit kidney cortical slices as a function of incubation time. All values represent means \pm S.E. of 6 experiments.

isethionate 및 SCN^- 으로 대체된 incubation 용액에서 incubation 시간을 120분까지 변화시키고 관찰한 결과 (표 4 및 그림 2), PAH는 incubation 시간이 길어짐에 따라 조직내 축적도 계속 증가하여 60분에서 S/M 비가 정상 Cl^- 용액에서 7.10, isethionate 으로 대체된 용액에서는 3.33 및 SCN^- 에서는 3.08에 달하였으며 그

이후에는 시간경과에 따른 S/M 비의 증가가 완전한 곡선을 보여 수평부를 나타내어 포화되는 현상을 보였다. 따라서 이후 실험에서는 incubation 시간을 60분으로 하였다.

정상군인 Cl^- 용액에서의 PAH S/M 비에 대한 실험군인 isethionate 및 SCN^- 용액에서 PAH S/M 비에 대한 백분율은 보면 (표 4) 60분까지는 incubation 시간이 길어짐에 따라 억제되는 경향을 보였다.

4) Isethionate 및 SCN^- 작용의 가역성

음이온인 isethionate 및 SCN^- 이 신피질 절편에서 PAH 이동에 미치는 효과에 대한 가역성을 알아보기 위하여, 절편을 Cl^- , isethionate 및 SCN^- 이 들어 있는 용액에서 30분간 preincubation 한 후 절편을 Cl^- , isethionate 및 SCN^- 이 들어 있는 용액으로 옮겨 60분간 incubation 하였다. 표 5에서 보는 바와 같이 preincubation 시 용액 중 어떤 음이온이라도 incubation 시 Cl^- 으로 incubation 하면 대조 PAH S/M 비로 돌아왔다. 한편 isethionate 가 들어 있는 용액으로 incubation 하면 preincubation 시 어떤 음이온이라도 PAH S/M 비가 4.03 또는 4.43으로 현저히 감소되었으며 ($p < 0.05$), 마찬가지로 SCN^- 에서도 S/M 비

Table 5. Uptake of PAH in rabbit kidney cortical slices preincubated and incubated in media of varying anionic composition. Slice-to-medium concentration(S/M) ratio of PAH after a 60-min incubation in incubation medium containing isethionate or SCN⁻ as a replacement for Cl⁻. Prior to this incubation, slices were preincubated for 30 min in a medium containing Cl⁻, isethionate or SCN⁻. The values shown are means±S.E. Data were analyzed using the unpaired Student's t-test and the probabilities shown are compared to the corresponding control in each series, i.e., Cl⁻ in both the preincubation and incubation. Numbers of parentheses indicate % S/M ratio compared with controls.

Series	Anion Composition		S/M Ratio
	Preincubation	Incubation	
Control	Cl ⁻	Cl ⁻	7.67±0.44 (100)
(I)	Cl ⁻	Isthionate	4.03±0.18** (52.54)
	Isthionate	Cl ⁻	7.42±1.34 (96.74)
	Isthionate	Isthionate	4.43±0.55** (57.76)
(II)	Cl ⁻	SCN ⁻	2.95±0.44** (38.46)
	SCN ⁻	Cl ⁻	8.86±0.96 (115.51)
	SCN ⁻	SCN ⁻	3.37±0.59** (43.94)

(**, p<0.05, statistically significant)

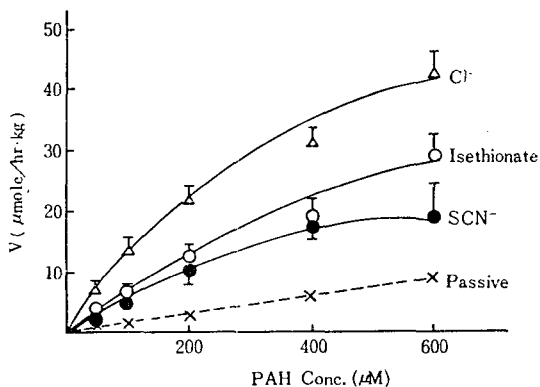


Fig. 3. Effect of anion on active PAH uptake. All values represent means±S.E. of 6 experiments.

가 2.95 또는 3.37로 감소하였다(p<0.05).

5) PAH 농도 변화에 따른 효과

Incubation 용액내 PAH 농도를 50에서 600 μM 까지 변화시키고 preincubation 30분 후 incubation 40분으로 PAH 농도 변화에 따른 isethionate 및 SCN⁻이 존재할 때와 존재하지 않을 때 나타나는 PAH의 능동적 이동량 및 수동적 이동량을 그림 3에 나타내었고, isethionate 및 SCN⁻이 어떤 기전에 의하여 PAH이

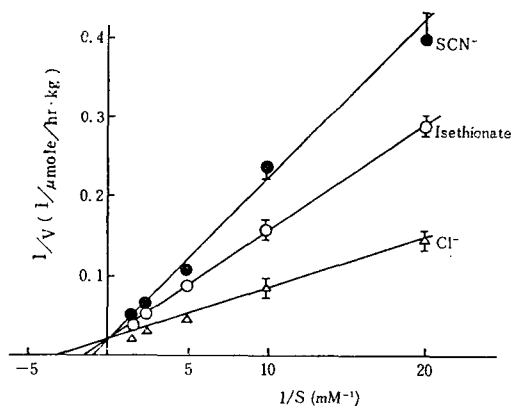


Fig. 4. Lineweaver-Burk analysis of the inhibitory effect of isethionate and SCN⁻ as a Cl⁻ replacement on PAH transport. Initial rate of transport(V) was determined during a 40 min incubation in media containing varying PAH concentrations(S).

동을 억제하는지를 구명하기 위하여 Lineweaver-Burk plot 한 결과(그림 4) isethionate 과 SCN⁻ 존재시 apparent Vmax는 60 m mole/g/hr로 일정하였으며 apparent Km 값은 대조군(Cl⁻) 0.40 mM에서 isethionate에서는 0.86 mM 및 SCN⁻에서는 1.33 mM로 증가하였으므로 isethionate 및 SCN⁻은 PAH 이동시 상경적으로 억제시키는 기전에 의한다고 볼 수 있다.

—서덕준 외 2인 : 가토 신피질 절편에서 PAH(*p*-aminohippuric acid) 이동에 미치는 음이온의 영향—

Table 6. Total tissue water content, inulin space and intracellular electrolyte concentration(Na^+ and K^+) of slices incubated in media containing isethionate and SCN^- as a substitute for Cl^- . Values are means \pm S.E. of four experiments. No value was significantly different from that of Cl^- .

Parameter Anion	Tissue H_2O (%)	S/M Ratio of Inulin	$[\text{Na}^+]_i$ ($\mu\text{Eq/g}$ wet wt.)	$[\text{K}^+]_i$ ($\mu\text{Eq/g}$ wet wt.)
Cl^-	77.25 \pm 1.29	1.01 \pm 0.05	68.83 \pm 2.61	91.27 \pm 2.96
Isethionate	78.01 \pm 0.72	0.98 \pm 0.05	65.94 \pm 1.59	93.54 \pm 4.66
SCN^-	79.38 \pm 0.56	1.20 \pm 0.07	65.90 \pm 3.06	98.46 \pm 5.71

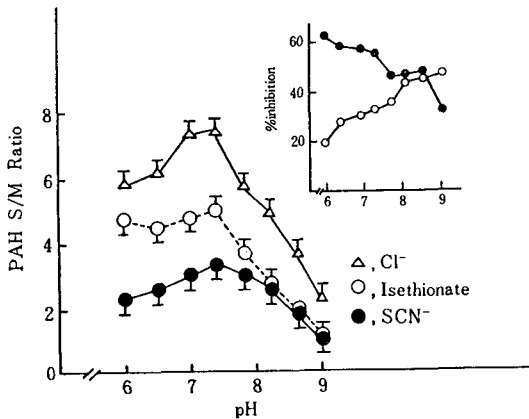


Fig. 5. Effect of pH of incubation medium on inhibitory action of isethionate and SCN^- to PAH uptake. Medium pHs were obtained by 10 mM imidazole (pH 6.0~7.0) and 10 mM Tris (pH 7.4~9.0) buffer at 28°C. All values represent means \pm S.E. of four experiments. Inlet shows % inhibition of PAH uptake compared to the corresponding control in medium containing isethionate (○) and SCN^- (●) as a replacement for Cl^- .

6) pH 변화에 따른 효과

Incubation 용액내의 pH 변화가 isethionate 및 SCN^- 이 PAH 이동의 영향에 어떤 효과를 나타내는지 를 관찰하기 위하여 pH 6.0~7.0까지는 10 mM imidazole buffer 로서, pH 7.4~9.0까지는 10 mM Tris buffer 로서 변동시켜 관찰하였더니 Cl^- , isethionate 및 SCN^- 모두 pH 7.4에서 PAH의 최대 축적치를 나타내었고(그림 5), 대조군인 Cl^- 에 대한 isethionate 및 SCN^- 의 PAH에 대한 억제효과는 isethionate 에서는 pH가 증가함에 따라 억제작용도 증가하였으나 SCN^- 에서는 이와는 달리 억제작용이 감소하였다.

7) 음이온이 PAH 이동시 일반적인 세포기능 및 활동성에 미치는 영향

표 6은 incubation 용액내 Cl^- 대신 isethionate 및 SCN^- 으로 대체시켰을 때 수분함량(%), 세포외액구간(S/M ratio of inulin) 및 세포내 Na^+ 및 K^+ 농도의 영향을 나타낸 것이다. 이들 모든 parameter에 대하여 이 두 음이온은 별 영향을 나타내지 못하였다.

또한 조직내 산소소모량도 별 영향이 없었다. 즉 대조군에서 $3.01\pm 0.3 \mu\text{l O}_2/\text{mg/h}$ 가 isethionate 에서는 $3.12\pm 0.31 \mu\text{l O}_2/\text{mg/h}$ 및 SCN^- 에 $3.05\pm 0.29 \mu\text{l O}_2/\text{mg/h}$ ($n=4, p>0.05$)이었다.

고 찰

일찌기 Forster(1948)에 의하여 절편법(slice technique)이 신장의 운반과정 연구에 도입된 이래 Cross 및 Taggart(1950)를 비롯하여 많은 연구자들(Chung et al., 1970; Forster and Copenhaver, 1956; Foulkes and Miller, 1959; Hong and Park, 1971; Hong et al., 1978; Huang and Lin, 1965; Ochwadt and Pitts, 1956; Rennick, 1972; Shideman et al., 1952; Weiner, 1973)에 의하여 이 방법이 각종 유기산 분비 과정 연구에 이용되어 그 운반기전을 더 깊이 구명할 수 있게 되었다(Ullrich, 1976).

그리고 이러한 약유기산의 분비과정은 대사에너지가 필요로 하는 능동적 과정임은 여러 연구자들에 의하여 입증되었다(Bernner and Kinne, 1976; Motais and Cousin, 1976; Ullrich, 1976; Weiner, 1973).

신절편 및 분리된 신세뇨관에서 PAH 이동이 Na^+ 이 나 K^+ 에 의해 영향을 받는다는 사실은 널리 알려져 왔으나(Chung et al., 1970; Forster and Copenhaver, 1956; Podevin and Boumendil-Podevin, 1977), 무기 음이온들의 영향에 대해서는 별로 연구된 바가 없기

때문에 이들 음이온들의 변화가 PAH 이동에 어떤 영향을 미치며 그 기전이 어떠한지에 대해서는 정확히 구명되지 않았다.

본 실험결과 Cl^- 대신 isethionate, SO_4^{2-} 및 SCN^- 으로 대체했을 때 PAH 이동이 이들 음이온들의 대체 정도에 따라 억제됨으로서 세포막을 잘 통과하는 음이온이나 잘 통과하지 않는 음이온이나 모두 PAH 이동을 억제함을 알 수 있었으며 이와같은 결과는 Goldinger 등(1980)의 보고와 일치하였다.

본 실험결과 isethionate⁻ 및 SCN^- 이 PAH와 상경적으로 억제현상을 보임으로서 이들 음이온들의 세포막의 한 부위에서 PAH와 상호작용할 것으로 가정할 수 있으며 Goldinger 등(1980)도 SCN^- 과 NO_3^- 의 경우 같은 결과를 보고하였다.

SCN^- 의 경우에는 basolateral membrane을 쉽게 통과하기 때문에 세포막전압에 변화를 유발시켜 PAH 이동을 억제할 가능성이 있으며 Na^+ 에 의존하는 glucose 이동에서 음이온의 세포막 투과 정도에 따라 막전압의 변화를 초래하여 glucose의 이동이 영향을 받는다는 사실이 밝혀졌고(Carter-Su and Kimmich, 1979), Berner와 Kinne(1976)도 Cl^- 대신 SCN^- 이 대체되었을 때 PAH 이동이 억제됨으로서 세포막 전압이 음성으로 증가할 때 PAH 이동이 영향을 받는다고 하였다.

그러나 Podevin 등(1979)은 심피질 절편에서 NO_3^- 과 SCN^- 용액속에 incubation했을 때 basolateral membrane potential의 큰 변화가 초래되지 않는다고 하였으며, Kimura와 Spring(1979)도 Necturus의 근위세뇨관에서 같은 결과를 보고하였다. 또한 Dantzer와 Bentley(1980)도 분리된 신세뇨관에서 SCN^- 이나 isethionate 등이 PAH 이동에 영향을 미치는 효과가 단순히 세포막 내외의 전위차 변화를 초래하여 나타내는 결과가 아님을 밝혔다. 만약 이들 무기 음이온들이 세포막전압에 변화를 초래하여 PAH 이동을 억제한다면 세포막을 쉽게 통과하지 못하는 isethionate나 SO_4^{2-} 은 PAH 이동을 증가시켜야 하며 glucose 경우에는 이들 이온들이 증가시키고 있다(Carter-Su and Kimmich, 1979). 그러나 본 실험결과 세포막을 쉽게 통과하는 음이온이나 쉽게 통과하지 못하는 음이온들이 모두 PAH 이동을 억제하고 있기 때문에, 이들 이온들의 변화가 세포막전압에 변화를 초래한다해도 그에 의한 영향은 그리 크지 않을 것으로 추측되며 이는 미세 유리전극을 이용하여 직접 세포막전압을 측정함으로써 확인할 수 있을 것이다.

Podevin 등(1978)은 음이온중 SCN^- 및 NO_3^- 에 incubation할 때 조직의 기능(tissue viability)이상을 초래할 수 있을 것이라고 가정하였으나, 본 실험에서는 수분함량, 전해질 농도 및 산소소모량 모두 큰 변화가 없어 isethionate 및 SCN^- 이 심피질 절편 조직기능에 별 영향을 미치지 않는다고 볼 수 있다. 따라서 isethionate나 SCN^- 이 세포막자체에 어떤 변화를 일으키지는 않을 것으로 생각되며 Goldinger 등(1980)도 SCN^- 이나 NO_3^- 이 수분함량, 전해질 농도 및 산소소모량 등에 변화를 초래하지 않으므로써 세포의 정상기능에 영향을 미치지 못한다고 하였다.

최근 Löw 등(1984)은 쥐의 신장 basolateral membrane의 소포체에서 무기 음이온과 유기 음이온의 공통적 음이온 교환제(common anion exchanger)가 존재하며 이는 Na^+ 차와 pH 차이에 의하여 작동될 수 있다고 하였으나 본 실험으로는 이 교환제에 대한 것은 잘 알 수 없어 더욱 추구되어야 할 것으로 생각된다.

SITS는 적혈구막에서 세포막을 통과하지 않고 세포막 외부에서 세포막의 amino group과 결합하여 음이온의 이동을 억제하고(Cabantchik and Rothstein, 1972; Rothstein et al., 1976; Snow et al., 1981), 심피질 절편에서도 PAH의 이동을 상경적으로 억제하는 것으로 밝혀져(Hong et al., 1978), 이 물질이 세포막의 amino group과 결합하여 음이온의 이동을 억제하는 작용을 나타낼 것으로 추측되고 있으며, 또한 lyotropic anion들이 amino group과 결합하는 것으로 보고된 바(Wieth, 1970) 있기 때문에 이들 음이온들이 세포막의 amino group과 결합하여 그 억제효과를 나타낼 가능성이 있다.

만일 SCN^- 이 SITS와 같이 세포막의 amino group과 결합하여 그 효과를 나타낸다면 $-NH_3^+$ 과 정전기적으로 결합하던지 아니면 $-NH_2$ 와 공유결합을 하게 될 것이며 따라서 $-NH_3^+$ 과 NH_2 가 용액내 pH에 따라 영향을 받기 때문에 SCN^- 의 억제효과가 pH 변화에 따라 달라질 것이다. 본 실험결과 pH 증가에 따라 SCN^- 에 의한 PAH 이동의 억제정도가 감소함으로써 $-NH_3^+$ 와 정전기적으로 결합할 가능성을 보이고 있으며, 이는 SCN^- 의 작용이 가역적으로 나타난 결과로서도 뒷받침된다.

그러나 isethionate은 반대로 pH가 증가함에 따라 억제정도가 증가하였는데 이는 $-NH_2$ 와 공유결합하기 때문인 것으로 보기는 힘들다.

그러나 본 실험의 결과 SCN^- 이나 isethionate이 PAH와 상경적으로 억제하기 때문에 PAH가 결합하

는 부위에 직접 작용하여 그 억제효과를 나타낼 것으로 추측되며 PAH와 이들 무기 음이온들이 동일한 운반체에 의하여 이동하는지는 더욱 추구하여야만 확인될 것으로 생각된다.

결 론

무기 음이온(isethionate 및 SCN^-)이 가토 신피질 절편에 작용하여 PAH의 이동에 미치는 효과를 관찰하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Incubation 용액내 Cl^- 대신 isethionate, SO_4^{2-} 및 SCN^- 을 100% 대체시키면 PAH의 절편 농도/용액 농도비(S/M)는 isethionate에서는 6.92에서 4.09로 약 60%, SO_4^{2-} 에서는 2.84로 약 40% 그리고 SCN^- 에서는 3.28로 약 50% 감소되었다.

2) 신피질 절편에서 isethionate 및 SCN^- 은 PAH 이동을 incubation 시간이 지남에 따라 감소시켰으며 60분에서 대조군인 Cl^- 용액의 PAH S/M비인 7.0이 isethionate에서 3.5 및 SCN^- 에서 3.0으로 감소되었다.

3) PAH 이동에 대한 isethionate 및 SCN^- 의 영향은 완전히 가역적으로 회복되었다.

4) Isethionate과 SCN^- 모두 PAH 이동 과정에서 Km치는 의미있게 증가시켰으나 V_{max} 치에는 변화를 보이지 않음으로서 상경적 억제현상을 나타내었다.

5) Incubation 용액내의 pH가 7.4일 때 PAH 이동이 최대로 나타났으며 isethionate 및 SCN^- 이 100% 대체되더라도 최적 pH에는 변화가 없었으나, pH가 증가함에 따라 isethionate의 억제효과는 증가될 때 반대로 SCN^- 의 효과는 반대로 감소되었다.

6) 수분함유량, 세포내 전해질 농도 및 산소소모량은 이들 무기 음이온에 의해서 영향을 받지 않았다.

이상의 결과로 보아 isethionate 및 SCN^- 이 가토 신피질 절편에서 유기산의 PAH 이동을 억제할 때 세포막 활동성에 영향을 미쳐 PAH 이동을 억제하기 보다는 PAH 운반체에 직접 결합함으로써 그 효과를 나타낼 것으로 추측된다.

REFERENCES

1) Albert, L. and Motais, R.: *Molecular features of organic anion permeability in ox red blood cell. J. Physiol.* 246:159, 1975.

2) Berner, W. and Kinne, R.: *Transport of p-*

aminohippuric acid by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. Pflügers Arch. 361:269, 1976.

3) Cabantchik, Z.I. and Rothstein, A.: *The nature of the membrane sites controlling anion permeability of human red blood cells as determined by studies with disulfonic stilbene derivatives. J. Membr. Biol.* 10:311, 1972.

4) Carter-Su, C. and Kimmich, G.A.: *Membrane potentials and sugar transport by ATP-depleted intestinal cells: effect of anion gradients. Am. J. Physiol.* 237:C67, 1979.

5) Chambers, R., Beck, L.V. and Belkin, M.: *Secretion in tissue culture. 1. Interaction of phenolred accumulation in the chick kidney. J. Cell and Comp. Physiol.* 6:425, 1935.

6) Cho, K.C., Kim, J.H., Hong, S.T. and Lee, W.C.: *Kinetic studies on the competition between para-aminohippuric acid(PAH) and diodrast for renal transport in the dog. Yonsei Med. J.* 1:25, 1960.

7) Chung, S.T., Park, Y.S. and Hong, S.K.: *Effects of cations on transport of weak organic acids in rabbit kidney slices. Am. J. Physiol.* 219:30, 1970.

8) Copenhaver, J.H. Jr. and Forster, R.P.: *Displacement characteristics of intra-cellularly accumulated p-aminohippurate in a mammalian renal transport system in vitro. Am. J. Physiol.* 195:327, 1958.

9) Cross, R.J. and Taggart, J.V.: *Renal tubular transport: Accumulation of p-aminohippurate by rabbit kidney slices. Am. J. Physiol.* 161:181, 1950.

10) Dantzer, W.H. and Bentley, S.K.: *Bath and lumen effects of SITS on PAH transport by isolated perfused renal tubules. Am. J. Physiol.* 238:F16, 1980.

11) Dantzer, W.H. and Bentley, S.K.: *Effects of chloride substitutes on PAH transport by isolated perfused renal tubules. Am. J. Physiol.* 241:F632, 1981.

12) Forster, R.P.: *Use of thin kidney slices and isolated renal tubules for direct study of*

- cellular transport kinetics. Science, 108:65, 1948.*
- 13) Forster, R.P. and Taggart, J.V.: *Use of isolated renal tubules for the examination of metabolic processes associated with active cellular transport. J. Cell and Comp. Physiol. 36:251, 1950.*
- 14) Forster, R.P. and Copenhaver, J.H. Jr.: *Intracellular accumulation as an active process in a mammalian renal transport system in vitro. Energy dependence and competitive phenomena. Am. J. Physiol. 186:167, 1956.*
- 15) Forster, R.P. and Hong, S.K.: *Tubular transport maxima of PAH and diodrast measured individually in the aglomerular kidney of Lophius, and simultaneously as competitors on the conditions of equimolar loading. J. Gen. Physiol. 45:811, 1962.*
- 16) Foulkes, E. and Miller, B.F.: *Transport of p-aminohippurate from cell to lumen in kidney tubule. Am. J. Physiol. 196:83, 1959.*
- 17) Goldinger, J.M. Erasmus, B.D., Song, Y.K., Koschier, F. and Hong, S.K.: *Effects of SCN^- and NO_3^- on organic transport in rabbit kidney cortical slices. Biochim. Biophys. Acta, 598:357, 1980.*
- 18) Halestrap, A.P.: *Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier. Biochem. J. 156:193, 1976.*
- 19) Hong, S.K. and Park, Y.S.: *Transport of bromocresol green in the rabbit kidney slices. Am. J. Physiol. 221:1779, 1971.*
- 20) Hong, S.K., Goldinger, J.M., Song, Y.K., Koschier, F.J. and Lee, S.H.: *Effect of SITS on organic anion transport in the rabbit kidney cortical slice. Am. J. Physiol. 234:F302, 1978.*
- 21) Huang, K.C. and Lin, D.S.T.: *Kinetic studies on transport of PAH and other organic acids in isolated renal tubules. Am. J. Physiol. 208:391, 1965.*
- 22) Kimura, G. and Spring, K.R.: *Luminal Na^+ entry into Necturus proximal tubule cells. Am. J. Physiol. 236:F295, 1979.*
- 23) Löw, I., Friedrich, T. and Burckhardt, G.: *Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles. Am. J. Physiol. 246:F334, 1984.*
- 24) Malvin, R.L., Wilde, W.S. and Sullivan, L.P.: *Localization of nephron transport by stop flow analysis. Am. J. Physiol. 194:135, 1958.*
- 25) Motais, R. and Cousin, J.L.: *The inhibitor effect of probenecid and structural analogues on organic anions and chloride permeabilities in ox erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 419:309, 1976.*
- 26) Mudge, G.H. and Taggart, J.V.: *Effect of acetate on the renal excretion of PAH in the dog. Am. J. Physiol. 161:191, 1950.*
- 27) Ochwaldt, B.K. and Pitts, R.P.: *Disparity between phenol red and diodrast clearance in the dog. Am. J. Physiol. 187:318, 1956.*
- 28) Peters, L.: *Renal tubular excretion of organic bases. Pharmacol. Rev. 12:1, 1960.*
- 29) Podevin, R.A. and Boumendil-Podevin, E.F.: *Monovalent cation and ouabain effects on PAH uptake by rabbit kidney slices. Am. J. Physiol. 232:F 239, 1977.*
- 30) Podevin, R.A. and Boumendil-Podevin, E. and Priol, C.: *Concentrative PAH transport by rabbit kidney slices in the absence of metabolic energy. Am. J. Physiol. 235:F274, 1978.*
- 31) Rennick, B.R. and Farah, A.: *Studies on the tubular transport of tetraethylammonium ion in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 116:287, 1956.*
- 32) Rennick, B.R.: *Renal excretion of drugs: Tubular transport and metabolism. Ann. Rev. Pharmacol. 12:141, 1972.*
- 33) Rothstein, A., Cabantchik, Z.I. and Knauf, P.: *Mechanism of anion transport in red blood cells: role of membrane proteins. Fed. Proc. 35:3, 1976.*
- 34) Rowntree and Geraghty: *Cited from Smith H.H. the kidney: Structure and function in*

- health and disease. Oxford University Press, p.171. New York, 1951.*
- 35) Schreiner, G.E.: *Determination of inulin by means of resorcinol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74:177, 1950.*
- 36) Shannon, J.A.: *Excretion of phenol red by the dog. Am. J. Physiol. 113:602, 1935.*
- 37) Shideman, F.E., Rathbun, R.C. and Stoneman, F.: *Inhibition of the renal tubular transport of p-aminohippurate(PAH) and phenolsulfonphthalein(PSP) as affected by acetate. Am. J. Physiol. 170:31, 1952.*
- 38) Snow, J.W., Vincentelli, J. and Brandts, J.F.: *A relationship between anion transport and a structural transition of the human erythrocyte membrane. Biochim. Biophys. Acta, 62:418, 1981.*
- 39) Sperber, I.: *Secretion of organic acids in the formation of urine and bile. Pharmacol. Rev. 11:109, 1959.*
- 40) Taggart, J.V. and Forster, R.P.: *Renal tubular transport: Effect of 2,4-dinitrophenol and related compounds on phenol red transport in the isolated tubules of the flounder. Am. J. Physiol. 161:167, 1950.*
- 41) Taggart, J.V., Silverman, L. and Trayner, E.M.: *Influence of renal electrolyte composition on the tubular excretion of p-aminohippurate. Am. J. Physiol. 173:345, 1953.*
- 42) Taggart, J.V.: *Mechanisms of renal tubular transport. Am. J. Med. 24:774, 1958.*
- 43) Ullrich, K.J.: *Renal tubular mechanisms of organic solute transport. Kidney Intern. 9:134, 1976.*
- 44) Weiner, I.M.: *Transport of weak acids and bases. In Handbook of Physiology, edited by Orloff, J. and Berliner, R.W. Washington, D.C.: Am. Physiol. Soc. p.521, 1973.*
- 45) Wieth, J.O.: *Effect of some monovalent anions on chloride and sulfate permeability of human red cells. J. Physiol. 207:581, 1970.*