

사람의 적혈구에서 용혈성을 이용하여 측정한 음이온 교환특성

부산대학교 의과대학 생리학교실

우 재 석 · 김 용 근

경상대학교 의과대학 내과학교실

황 일 용

= Abstract =

Characteristics of Anion Exchange Measured by the Rate of Hemolysis in Human Erythrocyte

Jae Suk Woo and Yong Keun Kim

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University

Il Yong Hwang

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyungsang National University

The characteristics of anion exchange with internal HCO_3^- (or OH^-) was studied by determining the time course of hemolysis in isoosmotic ammonium salt solution in human erythrocytes.

The effects of inhibitors, pH and temperature on the exchange between internal HCO_3^- (or OH^-) and external Cl^- were observed and the permeabilities of various organic and inorganic anions were also measured. The results were compared with data previously reported from the experiments using radioisotopes.

The results are as follows;

1) SITS, H_2DIDS and furosemide inhibited the hemolysis of erythrocytes in isoosmotic NH_4Cl solution in a dose-dependent manner, and the concentrations for lengthening twice the time for half-hemolysis ($t_{1/2}$) were 2.3×10^{-7} , 1.3×10^{-7} and $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$, respectively.

2) Acetazolamide also shifted the time-dependent hemolytic curve to the right in a dose-dependent manner, and the concentrations for lengthening twice $t_{1/2}$ was $2.4 \times 10^{-5}\text{M}$.

3) The time-dependent hemolysis was delayed by decreasing pH from 7.0 to 6.2, but was not affected by the change of pH in the range of 7.0 to 8.2.

4) The time for half-hemolysis ($t_{1/2}$) showed a temperature-dependency and Arrhenius plot exhibited a break point at 20°C . The apparent activation energy calculated from this plot was 18.1 kcal/mol between 2°C - 20°C and 11.2 kcal/mol between 20°C - 37°C , respectively.

5) The apparent permeabilities of various inorganic anions based on $t_{1/2}$ were in the order of $\text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SCN}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{SSO}_3^{2-} > \text{HPO}_4^{2-}$, which was similar with the previous reports based on the experiments using radioisotopes.

The results obtained from this study are comparable with the previous data reported from the experiments using radioisotopes. This indicates that the hemolysis of erythrocytes in isoosmotic ammonium salt solution can be used as a simple and good method for the study of anion exchange in erythrocyte membrane.

서 론

적혈구 막에서 가장 중요한 특성 중의 하나인 음이온 교환 기전에 관해서는 이미 많은 연구가 이루어져 그 동력학적 성상이나 기전이 잘 알려져 있다(Fortes, 1977; Gunn, 1979; Knauff, 1979).

지금까지 적혈구 막에서 음이온 이동에 관한 실험은 주로 동위원소를 이용하여 행해지고 있으나 이들 여러가지 음이온들의 동위원소를 확보하는 어려움에도 적혈구 막에서의 투과도가 아주 높은 음이온들의 이동을 정확하게 측정하는데 실험상의 어려움이 있었다. 실제 37°C에서 ³⁶Cl⁻을 이용한 Cl⁻ self-exchange의 half-time은 57 msec에 불과하며(Brahm, 1977) Cl⁻-HCO₃⁻ 교환에 있어서도 평형에 도달하는 시간이 0.3~0.5 sec 정도로 알려져(Cousin et al., 1975) Dalmark등(1972)은 빠른 시간에 세포 성분과 배양액을 분리할 수 있는 filtration method에 의해서도 20°C 이상에서는 ³⁶Cl⁻의 이동을 정확히 측정하기 어렵다고 하였다.

적혈구에서 동위원소를 이용한 방법 외에 적혈구의 삼투적 용적 변화나 용혈시간을 측정함으로써 물질의 투과 정도를 관찰할 수 있다.

Jacobs와 Steward(1942) 및 Aubert와 Motais등(1975)은 등삼투성 암모늄염 용액에서의 용혈을 이용함으로써 음이온의 이동을 관찰하였으며 Jacobs 및 Wessels등은 적혈구의 용혈시간을 측정하여 이동 물질들의 투과도 상수를 계산할 수 있음을 기술한 바 있다(Maccy, 1979). 이 방법은 여러가지 음이온들의 투과도를 측정하고 비교하는데 매우 간편하기 때문에 쉽게 이용할 수 있는 방법이다.

본 실험에서는 여러가지 음이온들의 암모늄염을 이용하여 적혈구의 용혈 시간을 관찰함으로써 이들 음이온들의 이동 정도를 비교하고 적혈구 막에서의 음이온 교환 운반체로 밝혀진 band 3 단백질에 작용하는 여러가지 약물의 효과와 pH 및 온도 변화의 효과를 관찰하여 지금까지의 동위원소를 이용한 실험에서 밝혀진 결과들과 비교 관찰하고자 하였다.

실험원리 및 방법

본 실험의 이론적 배경을 요약하면 그림 1에서와 같다.

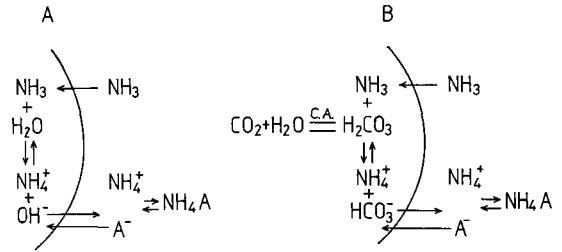


Fig. 1. Transfer process involved in the net movement of ammonium salt (NH₄A) in erythrocytes. A, in CO₂-free medium; B, in presence of CO₂ and carbonic anhydrase (C.A.)
Figures are adapted from Aubert and Motais (1975).

등삼투성 암모늄염 용액에서의 적혈구의 용혈 과정을 나타낸 모식도로서 그림 A는 CO₂가 없는 용액, B는 대기와 평형시켜 CO₂가 존재하는 용액에서의 과정을 나타낸다. 암모늄염에서 분리된 NH₃는 적혈구 막의 지방층을 통해 쉽게 확산해 들어가며 세포내에서 OH⁻ 혹은 HCO₃⁻을 생성한다. 그러나 NH₄⁺이온은 다른 양이온들과 같이 적혈구막에 대한 투과도가 낮다. 세포외부의 음이온(A⁻)은 위의 OH⁻나 HCO₃⁻과 교환하여 이동하게 되며 음이온 한 분자의 이동은 결국 NH₄A 한 분자가 세포내로 이동한 결과가 되며 이에 따른 물의 이동으로 용적의 변화와 용혈을 일으키게 된다. 따라서 암모늄 염에 의해 생긴 용혈의 속도는 음이온 교환 기전에 의한 음이온의 이동 속도에 비례한다. 대기와 평형시킨 상태에서의 등 삼투성 암모늄염 용액에서의 용혈은 주로 HCO₃⁻와의 교환기전이 rate-limiting step으로 작용하며 OH⁻와의 교환기전에 비해 훨씬 그 속도가 빠른 것으로 알려져 있다. 이는 Cousin등(1975)에 의해 CO₂가 없는 용액이나 carbonic anhydrase 억제 물질에 의해 적혈구 용혈 시간이 연장됨을 관찰함으로써 확인된 바 있다. 적혈구 용혈 정도의 측정은 Aubert와 Motais(1975)의 방법을 이용하였는데 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. Heparin을 항응고제로 사용하여 채취한 혈액을 등장성 식염수 용액(155 mM NaCl, 5 mM Tris, pH 7.4)으로 3번 세척하여(2,000×g, 10 min) 혈장과 부유층을 제거한 다음 최종 적혈구 세포를 hematocrit치가 10% 되도록 등장성 식염수 용액에 부유시켰다. 이 적혈구 부유액 25 μl을 실험하고자 하는 음이온의 등삼투성 암모

늄염 용액(166 mM NH₄A, 5 mM Tris, pH 7.4) 3 ml 에 넣어 잘 섞은 다음 적혈구의 용혈에 따른 흡광도의 감소 정도를 610 nm에서 측정하여 시간에 따라 %로 환산하여 나타내었다.

실험결과 및 고찰

1. NH₄Cl 용액에서의 적혈구 용혈 곡선

그림 2는 등삼투성 NH₄Cl 용액에 적혈구를 첨가하였

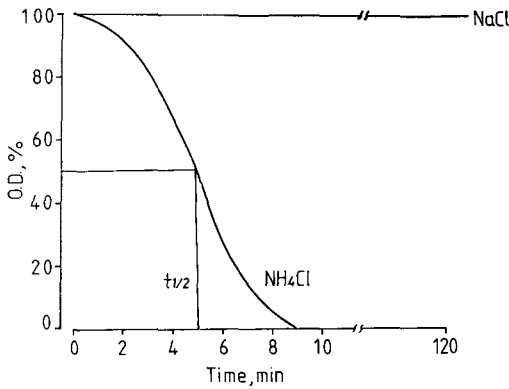


Fig. 2. Time course of optical density (O.D.) changes of erythrocytes suspended in isoosmotic NaCl or NH₄Cl solutions. Determination of the time for half-hemolysis ($t_{1/2}$) is shown together.

을 때 용혈에 따른 흡광도의 감소를 시간에 따라 나타낸 것이다. 등장성 NaCl 용액에서는 3시간 후에도 유의한 흡광도의 변화가 없었다. 흡광도가 1/2로 감소하는데 걸리는 시간을 $t_{1/2}$ 이라 하면 $t_{1/2}$ 이 음이온의 상대적인 이동 속도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 Kitagawa등 (1982)이 기술한 바 있다.

2. SITS, H₂DIDS, Furosemide의 영향

그림 3~5는 적혈구 막에서 band 3 단백질에 작용하

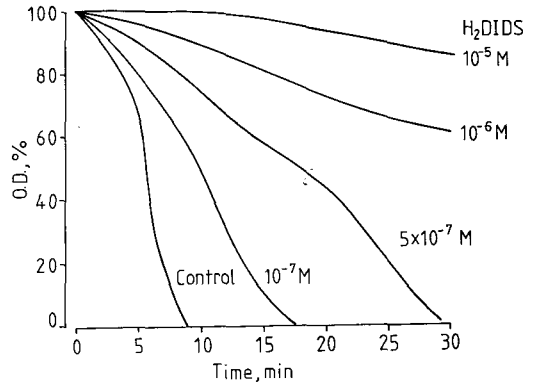


Fig. 4. Effects of various concentrations of H₂DIDS or the time course of hemolysis in isoosmotic NH₄Cl solution.

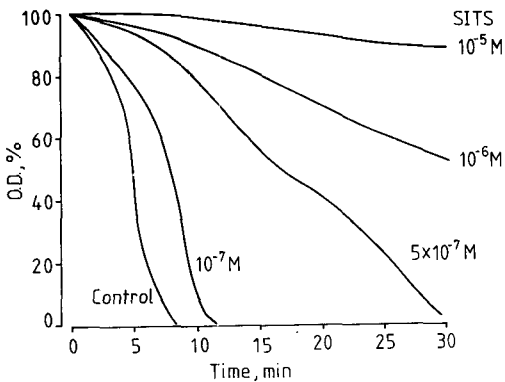


Fig. 3. Effects of various concentrations of SITS on the time course of hemolysis in isoosmotic NH₄Cl solution.

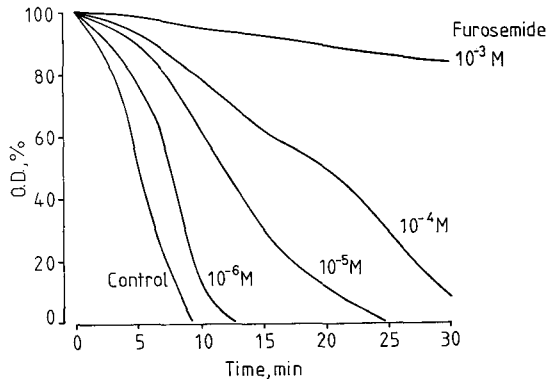


Fig. 5. Effects of various concentrations of furosemide on the time course of hemolysis in isoosmotic NH₄Cl solution.

Table 1. Concentrations of SITS, H₂DIDS and furosemide for lengthening twice the time for half-hemolysis ($t_{1/2}$) in isoosmotic NH₄Cl solution. For comparison K_1 values previously reported from the experiments using radioisotopes are presented together

	SITS	H ₂ DIDS	Furosemide
Conc. for lengthening twice $t_{1/2}$ (M)	2.3×10^{-7}	1.3×10^{-7}	2.5×10^{-5}
K_1 (M)	$2.3 \times 10^{-7a)}$	$3 \times 10^{-7b)}$	$1.4 \times 10^{-5c)}$

- a) Cabantchik and Rothstein (1972)
- b) Shami et al. (1978)
- c) Brazy and Gunn (1976)

여 음이온 교환기전을 억제하는 것으로 알려진 SITS (Cabantchik and Rothstein, 1972), H₂DIDS (Shami et al., 1978) 및 furosemide (Brazy and Gunn, 1976)가 NH₄Cl 용액에서의 적혈구 용혈곡선에 미치는 영향을 관찰한 것이다. 셋 모두 농도에 따라 적혈구 용혈 곡선을 오른쪽으로 이동시켰으며 SITS와 H₂DIDS는 10⁻⁵M에서 furosemide는 10⁻³M에서 3시간 이상까지 용혈을 억제하였다. 표 1은 $t_{1/2}$ 을 2배로 연장시킨 각 약물의 농도를 지금까지의 동위원소를 이용한 실험에서 Cl⁻의 이동을 50% 억제하는 것으로 보고된 K_1 값과 비교한 것이다. H₂DIDS의 경우는 K_1 치와 비슷한 값을 보였으나 SITS와 furosemide의 경우는 20~50배 정도 낮은 값을 보였다. 이러한 차이에 대해서는 정확히 알 수 없으나 K 값들이 모두 0°C에서 행한 실험에서 얻은 값들이고 본 실험은 37°C에서 행하였기 때문에 온도 차이에서 나타날 수도 있을 것이다.

3. Acetazolamide의 영향

적혈구 세포내의 carbonic anhydrase를 억제함으로써 HCO₃⁻-Cl⁻ 교환 기전을 억제하는 것으로 알려진 (Kellin and Mann, 1941; Maren and Wiley, 1970) acetazolamide의 효과를 관찰한 결과 농도에 비례하여 적혈구의 시간에 따른 용혈 곡선을 오른쪽으로 이동시켰다(그림 6). 하지만 carbonic anhydrase를 완전히 억제하는 것으로 알려진 (Cousin et al., 1975) 10⁻⁶M의 농도에서도 적혈구 용혈 곡선에는 거의 영향을 나타내지 못하고 있으며 용혈을 완전히 억제하는 농도도 carbonic

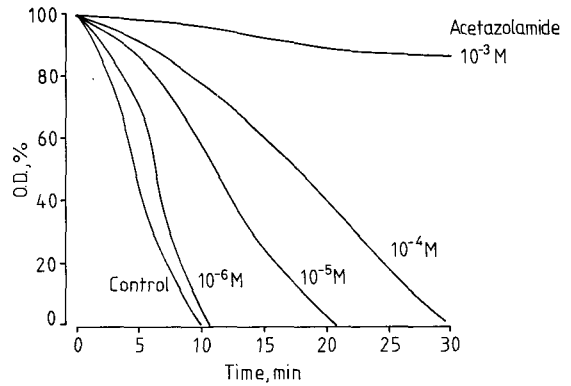


Fig. 6. Effects of various concentrations of acetazolamide on the time course of hemolysis in isoosmotic NH₄Cl solution.

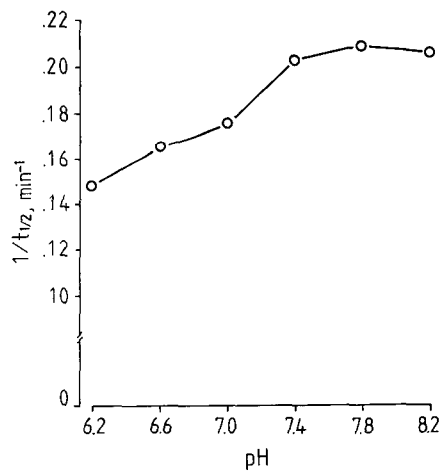


Fig. 7. Effect of pH on the time for half-hemolysis ($t_{1/2}$) in isoosmotic NH₄Cl solution.

anhydrase를 완전히 억제하는 농도보다 10³배 이상 높았다. 이러한 결과의 이유는 확실치 않으나 Maren 등(1970)은 carbonic anhydrase가 99.5% 이상 억제되기 전에는 적혈구 용혈에 뚜렷한 영향을 미치지 못함을 보고한 바 있고 이 약물의 작용기전이 이 효소에 대한 작용보다는 음이온의 교환에 직접 영향을 미쳐 나타날 것으로 시사한 바 있다.

4. pH의 영향

음이온 교환기전의 중요한 특징의 하나인 pH 의존성

을 본 실험에서도 볼 수 있었다. 그림 7은 pH 변화에 따른 $1/t_{1/2}$ 의 변화를 나타낸 것으로 pH range를 6.2에서 8.2까지 변화시켰을 때 pH 7.4 이상에서 높은 값을 보여주었으며 7.0이하에서는 적혈구 용혈 시간이 연장되었다. 이러한 pH 의존성은 Gunn등(1973)의 보고와 일치한다. 이러한 효과가 pH 변화에 따른 NH_4^+ 의 해리 정도에 영향을 주어 나타날 수 있으나 NH_4^+ 의 pKa가 9.25(at 25°C)로서 본 실험에서의 pH range에서 이러한 해리 정도에 의한 효과는 아닐 것으로 사료된다.

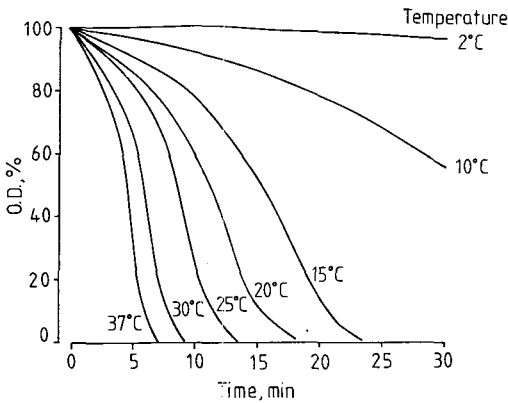


Fig. 8. Effects of temperature on the time course of hemolysis in isoosmotic NH_4Cl solution.

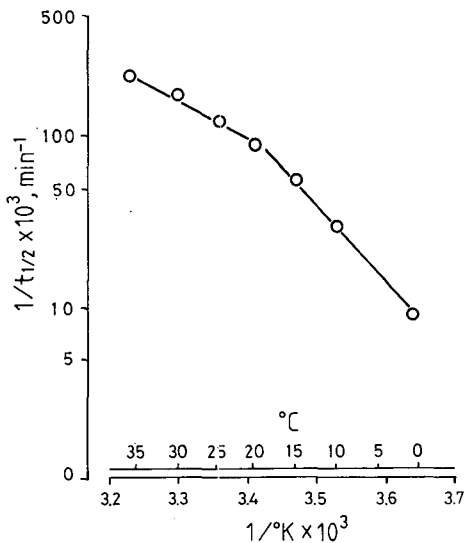


Fig. 9. Arrhenius plot of $1/t_{1/2}$ obtained from Fig. 8.

Table 2. Parameters of temperature dependency obtained from Arrhenius Plot

Parameter	This study	Obaid et al. (1978)
Break point	20°C	17°C
Activation Energy (kcal/mol)		
2°C ~ 20°C	18.1	18.6
20°C ~ 37°C	11.2	11.4

5. 온도의 영향

지금까지 동위원소를 이용한 실험에서 가장 큰 문제점이 적혈구 막의 음이온에 대한 높은 투과성 때문에 높은 온도 범위에서의 정확한 측정이 어렵다는 점이었는 데 본 실험에서는 쉽게 2°C ~ 37°C 사이의 넓은 범위에서의 관찰이 가능하였다(그림 8). 그림 9는 각 온도에서의 $1/t_{1/2}$ 을 Arrhenius plot 하여 나타낸 것으로 높은 온도 의존성을 보이고 있으며 20°C에서 최절되는 양상을 보였다. 표 2는 여기서 구한 activation energy를 Obaid등(1978)과 Crandall등(1978)이 보고한 값과 비교하여 나타낸 것으로 거의 일치함을 알 수 있다.

6. 여러가지 무기 및 유기 음이온의 영향

Band 3 단백질은 Cl^- 뿐만 아니라 여러가지 1가 및 2가 음이온 외에 유기 음이온의 이동에도 관여하는 것으

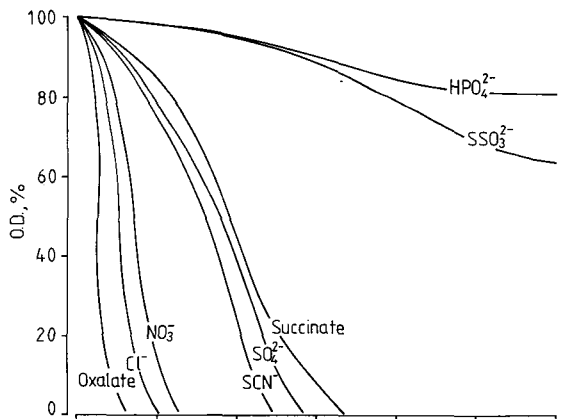


Fig. 10. Time course of hemolysis in isoosmotic ammonium salt solution of various organic and inorganic anions.

Table 3. Values of t_+ in isoosmotic ammonium salt solution of various organic and inorganic anions. For comparison relative rate of permeability previously reported from the experiments using radioisotopes are presented together.

Anions	t_+ (min)	Relative rate of permeability*
(Inorganic)		
monovalent		
Cl ⁻	5.2 ± 0.51	1
NO ₃ ⁻	6.4 ± 0.40	0.31
SCN ⁻	16.4 ± 1.45	0.034
divalent		
SO ₄ ²⁻	18.2 ± 2.01	<0.0001
SSO ₃ ²⁻	215.2 ± 15.02	—
HPO ₄ ²⁻	242.2 ± 10.05	<0.00003
(Organic)		
oxalate	2.1 ± 0.45	—
succinate	17.1 ± 2.02	—

*Dalmark and wieth (1972); Knauf (1979)

로 알려져 있다(Dalmark and Wieth, 1972; Fortes, 1977; Frölich and Gunn, 1986; Gunn, 1979; Knauf, 1979). 그림 10은 Cl⁻대신 여러가지 다른 무기 음이온 및 유기 음이온을 대치하였을 때의 용혈 곡선을 나타낸 것이며 표 3은 각 음이온에서의 t_+ 를 지금까지 동위원소를 사용한 실험에서 보고된 상대적 투과도를 비교하여 나타낸 것으로 그 상대적 투과도의 순서가 동일함을 볼 수 있다. 유기 음이온의 경우 oxalate는 Cl⁻보다 훨씬 빠른 용혈을 보였고 succinate의 경우는 용혈 시간이 연장되었다. 특히 oxalate와 같이 Cl⁻보다 이동이 빠른 물질은 지금까지의 방법으로는 동위원소를 사용해서 그 이동 양상을 정확히 측정하기 힘들 것으로 생각된다. 유기 음이온의 경우 해리되지 않은 상태로 확산될 가능성이 있으나 oxalate와 succinate의 경우 pH 7.4에서 대부분 음이온 상태로 이동됨이 확인된 바 있다(Aubert and Motais, 1975).

이상의 결과를 종합하면 등삼투성 암모늄 염 용액에서의 적혈구 용혈성을 이용하여 관찰한 음이온 이동에 관한 본 실험에서 얻은 결과들이 지금까지의 동위원소를 이용한 실험 성적들과 유사한 결과를 보여 주고 있으며 특히 이동율이 아주 빠른 음이온이나, 높은 온도 범위에서의 음이온 이동을 관찰하는데는 동위원소를 사용할 실험

의 단점을 보완할 수 있는 장점도 있어 적혈구의 음이온 이동 기전을 관찰하는데 간편하고 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

사람의 적혈구에서 여러 가지 음이온들의 등삼투성 암모늄 염으로 된 용액속에서의 용혈성을 이용하여 이들 음이온들이 HCO₃⁻ 혹은 OH⁻와 교환되어 이동되는 정도와 몇 가지 억제 물질의 영향, pH 및 온도 변화의 효과를 관찰하여 그 결과를 지금까지 방사성동위원소를 이용한 실험에서 보고된 성적들과 비교하였다.

SITS, H₂DIDS, furosemide 등은 농도에 비례하여 등삼투성 NH₄Cl 용액에서의 용혈 시간을 연장시켰으며 t_+ 을 2배로 연장시킨 농도는 각각 $2.3 \times 10^{-7}M$, $3 \times 10^{-7}M$, $2.5 \times 10^{-5}M$ 이었다. Acetazolamide도 농도에 비례하여 적혈구 용혈 시간을 연장시켰으며 t_+ 을 2배로 연장시킨 농도는 $2.4 \times 10^{-5}M$ 이었다. 온도를 2°C에서 37°C까지 변화시키며 적혈구 용혈 시간을 관찰했을 때 높은 온도 의존성을 보였으며 $1/t_+$ 을 Arrhenius plot하였을 때 20°C에서 최절점을 보였고 activation energy는 2°C ~ 20°C에서 18.1 kcal/mol, 20°C ~ 37°C 범위에서 11.2 kcal/mol이었다. 여러가지 무기 음이온의 투과도를 t_+ 을 기준으로 비교했을 때 Cl⁻ > NO₃⁻ > SCN⁻ > SO₄²⁻ > SSO₃²⁻ > HPO₄²⁻의 순이었으며 유기 음이온 중 oxalate는 Cl⁻보다 높은 투과도를 succinate는 낮은 투과도를 보였다.

이상의 결과를 종합하면 등삼투성 암모늄 염 용액에서의 적혈구 용혈성을 이용하여 음이온 이동에 대하여 관찰한 결과들이 지금까지의 동위원소를 이용한 실험 성적들과 유사한 결과를 보여주고 있으며 특히 이동률이 빠르거나, 높은 온도 범위에서의 음이온의 이동을 관찰하는 데는 동위원소를 이용한 실험의 단점을 보완할 수 있는 장점도 있어 이 방법이 적혈구 막을 통한 음이온의 이동 기전과 이에 영향을 미치는 인자들을 연구하는 데 간편하고 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

Aubert, L. and Motais, R.: *Molecular features of organic anion permeability in ox red blood cell. J. Physiol.*,

- 246:159, 1975.
- Brahm, J.: *Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells.* *J. Gen. Physiol.*, 70:283, 1977.
- Brazy, P.C. and Gunn, R. B.: *Furosemide inhibition of chloride transport in human red blood cells.* *J. Gen. Physiol.*, 68:583, 1976.
- 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.
- Cousin, J. L., Motais, R. and Sola, F.: *Transmembrane exchange of chloride with bicarbonate ion in mammalian red blood cells: evidence for a sulfonamide-sensitive carrier.* *J. Physiol.*, 253:385, 1975.
- Crandall, E.D., Obaid, A.L. and Forster, R.E.: *Bicarbonate-chloride exchange in erythrocyte suspension. Stopped-flow pH electrode measurements.* *Biophys. J.* 24:35, 1978.
- Dalmark, M. and Wieth, J.O.: *Temperature dependence of chloride, bromide, iodide, thiocyanate and salicylate transport in human red cells.* *J. Physiol.*, 224: 583, 1972.
- Fortes, P.A.: *Anion movements in red cells, in membrane transport in red cells' ed. by Ellory, J.C. and Lew. V.L. p 175. Academic Press, New York, 1977.*
- Fröhlich, O. and Gunn, F.B.: *Erythrocyte anion transport: the kinetics of a single obligatory exchange system.* *Biochem. et Biophys. Acta*, 864:169, 1986.
- Gunn, R.B.: *Considerations of the titratable carrier model for sulfate transport in human red blood cells in "Membrane Transport Procèss" ed. by J.E. Hoffman, p 61. Raven, New York, 1979*
- Gunn, R.B., Dalmark, M. and Tosteson, D.C.: *Characteristics of chloride transport in human red cells.* *J. Gen. Physiol.*, 61:165, 1973
- Jacobs, M.H.: *in Trends in Physiology and Biochemistry ed. by Barron, E.S.G. Academic Press, New York, 1952.*
- Jacobs, M.H. and Steward, D.R.: *The role of carbonic anhydrase in certain ionic exchanges involving the erythrocyte.* *J. Gen. Physiol.*, 25:539, 1942.
- Kitagawa, S., Terada, H. and Kametani, F.: *Transport of benzenesulfonic acid derivatives through the rat erythrocyte membrane.* *J. Membr. Biol.*, 65:49, 1982.
- Klocke, R.A.: *Activity of carbonic anhydrase within red blood corpuscles.* *Nature, Lond.* 148:493, 1941.
- Knauf, P.A.: *Erythrocyte anion exchange and the band 3-protein: transport kinetics and molecular structure. in current topics in membranes and transport Vol. 12, Academic Press, Inc. 1979.*
- Maccy, R.I.: *in Transport of water and nonelectrolytes across red cell membranes, Membrane transport in biology II. ed. by Giebisch, G. et al. Springer-Verlag, New York, 1979.*
- Maren, T.H. and Wiley, C.E.: *Kinetics of carbonic anhydrase in whole red cells as measured by transfer of carbon dioxide and ammonia.* *Molec. Pharmacol.*, 6: 430, 1970.
- Obaid, A.L., Crandall, E.D. and Forster, R.E.: *Bicarbonate-chloride exchange in human erythrocytes: Effects of pH and temperature.* *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 37:313, 1978.
- Shami, Y., Rothstein, A. and Knauf, P.A.: *Identification of the Cl⁻ transport site of human red blood cells by a kinetic analysis of the inhibitory effects of a chemical probe.* *Biochim. Biophys. Acta*, 508:357, 1978.