

## 흰쥐에 Methanethiol 投與가 赤血球膜 損傷에 미치는 影響

정소웅 · 윤종국\*

대구보건전문대학 임상병리과, \*계명대학교 자연대학 공중보건학과

### Effect of Methanethiol Administration on the Erythrocyte Damage in Rats

So-Woong Jeong and Chong-Guk Yoon\*

Department of Pathology, Taegu Health Junior College

\*Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

#### ABSTRACT

To evaluate an effect of methanethiol on a cause of erythrocyte membrane damage in rats, methanethiol was given at 11.25 mg/100 g body weight, and after 4 hr, the animals were sacrificed, the activities of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, protein contents in partial purified erythrocyte membrane and erythrocyte indices were determined. Concomitantly, *in vitro*, effect of methanethiol on the erythrocyte fragility,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity and its kinetics in various concentration of substrate from the preincubated erythrocyte membrane with methanethiol were demonstrated. The spleen weight per body weight (%) and MCV of erythrocyte in methanethiol-treated rats were more increased than those in the control group. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activities in erythrocyte membrane were more decreased in methanethiol-treated rats than those in the control group. The apply of 0.05 ml/rat whole blood to the 0.24 mg/ml of methanethiol solution in isotonic condition showed the complete hemolysis. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase activity in preincubated erythrocyte membrane with methanethiol at 37°C showed the dual effect and the  $K_m$  value of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase was higher in the preincubated erythrocyte membrane with methanethiol than that in the preincubated erythrocyte membrane omitted the methanethiol. These results suggest that the methanethiol may induce the damage of rat's erythrocyte membrane due to a change in substrate binding affinity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

**Keywords :** Methanethiol, erythrocyte,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

#### I. 緒 論

Methanethiol은 精油工場에서 副産되는 産業公害物質<sup>1)</sup>임과 동시에 生體內에서는 methionine 過量攝取時에 탈아미노 反應에 의해 生成되는 3-methylthiopropionate로부터 由來되는 物質로 알려져 있을 뿐만 아니라,<sup>2)</sup> 腐敗된 食品<sup>3,4)</sup> 및 醱酵酒<sup>5)</sup>로부터 攝取하기도 하며 小腸에서 嫌氣性 細菌에 의하여 未吸收殘存食餌性 蛋白質로부터 由來된  $\text{H}_2\text{S}$ 가 小腸粘膜에 存在하는 S-methyltransferase의 作用을 받

아 生成되기도 하는 内外因性 毒性物質<sup>6,7)</sup>로도 알려져 있다.

Methanethiol은 中樞神經障害 뿐만 아니라 肝損傷이 심한 환자에서 肝性昏睡를 惹起시키는 毒性物質<sup>8)</sup>로 알려져 있으며, 또한 生體內 投與時 生體膜의 機能을 유지시켜 주는 酵素들의 活性을 저해시키거나, 生體膜과 직접 결합함으로써 膜成分을 변화시켜 生體膜 損傷을 招來함이 報告<sup>9)</sup> 되었다.

한편 赤血球膜에 存在하는  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase는 2개의  $\alpha$ -chain 및 2개의  $\beta$ -chain으로 構成되어 있으며,  $\alpha$ -chain의 分子量은 約 47,500 daltons이며  $\beta$ -chain은 糖蛋白質로서 그 分子量이 約 27,500 dal-

\*To whom all correspondence should be addressed.

tons으로, 細胞內的  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 의 能動的 運搬에 參與하는 ATP 依存性 酵素蛋白質로서 cell volume 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup>

Jacob 等<sup>11)</sup>은 赤血球膜의 能動運搬기구가 溶血性 과 관련성이 있음을 보고하였으며, 최근 鄭과 尹<sup>12)</sup>은 試驗管内에서 methanethiol의 人赤血球膜 ATPase 活性을 억제시킴을 觀察한 바 있다.

따라서 methanethiol이 生體膜의 機能과 관련된 酵素的 活性을 억제시킴으로써 赤血球膜 損傷이 惹起될 것으로 생각된다. 이에 本 研究에서는 實驗動物로부터 採取한 赤血球에 methanethiol의 添加가 赤血球의 溶血性에 어떠한 影響을 미치는지를 檢討하는 한편, methanethiol을 實驗動物에 投與한 다음 赤血球膜 脂質 및 蛋白質 含量의 變動과  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性變動을 相互 比較 檢討하여 methanethiol이 赤血球膜 損傷에 미치는 影響을 밝히고자 하였으며 또한 methanethiol에 依한  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性變動의 機轉을 究明하는 一環으로 反應速度論的인 側面에서 觀察하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 動物의 處置

#### (1) 實驗動物의 飼育

實驗動物은 體重이 60~70g이 되는 外見上 健康한 Sprague-Dawley種의 6週齡을 飼料成分表(Table 1)에 依하여 調製된 標準食餌로 1個月 程度 飼育한 體重 210~230g되는 것을 使用하였다. 各 實驗條件의 實驗群들은 各各 性別로 分離 收容하였으며 물과 飼料의 量은 制限없이 供給하였다.

#### (2) Methanethiol의 投與

Methanethiol 投與는 methanethiol을 生理食鹽水와 1:1의 混合液을 만들어 體重 100g當 11.25mg을 腹腔 內로 投與한 다음 4時間 後에 實驗動物을 處置하였다.

#### (3) 實驗動物의 處置

各 實驗動物의 處置는 ether 痲醉下에 腹部 正中線을 따라 開腹한 다음 腹部 大動脈에서 heparin으로 처리한 滅菌된 注射器로 血液을 採血하였다. 採取된 血液은 赤血球 溶血性檢査와 赤血球恒數測定 및 赤血球膜을 分離하여 化學的 檢査에 提供하였다.

### 2. 원주 赤血球膜의 分離

赤血球膜의 分離는 Rosenberg와 Guidotti의 方法<sup>13)</sup>에 準하였다. 즉 원주의 血液을 採取, 원심분리하여 plasma와 buffy coat를 제거한 다음, packed cell vol-

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

Ingredients	Quantities
Casein	200
Corn starch	674.36
Corn oil	64.85
Vitamin A and D mixture (a)	10.2
Vitamin E and K mixture (b)	2
Water soluble vitamin mixture (c)	3
Vitamin B <sub>12</sub> (d)	1
Salt mixture (e)	40
α-Cellulose	20

\*4081 kcal.

<sup>a</sup>Vitamin A & D mixture : 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100 ml of corn oil.

<sup>b</sup>Vitamin E & K mixture : 5g of α-tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200 ml of corn oil.

<sup>c</sup>Water soluble vitamin mixture : Contained (mg); choline chloride 2000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, P-aminobenzoic acid 100.

<sup>d</sup>Vitamin B<sub>12</sub> : 5 mg of vitamin B<sub>12</sub> dissolved in 500 ml of distilled water.

<sup>e</sup>Salt mixture : Contained (g) : CaCO<sub>3</sub> 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSO<sub>4</sub> 102, Ca-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl<sub>2</sub> 0.25, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3, MnSO<sub>4</sub> 5, molybdic acid 0.2.

ume의 6倍量에 해당하는 氷冷 0.9% NaCl 용액으로 4번 cell washing하여 침전시킨 赤血球에 5倍量의 1 mM Tris buffer-1 mM EDTA(pH 7.0)를 加하고 15分間 방치하여 赤血球를 溶血시켰다. 이 溶血液을 4℃에서 20,000×g로 15分間 遠心分離하여 얻은 침전물에 다시 5倍量의 상기 1 mM Tris buffer-1 mM EDTA(pH 7.0)으로 1회, 3倍量으로 2회 원침한 후 10 mM EDTA 용액으로 1회, 다시 1 mM Tris buffer-1 mM EDTA에서 1회, 0.5 M NaCl로서 1회, 0.5 mM histidine-imidazole buffer (pH 7.0)에서 4회 20,000×g에서 遠心分離하여 最終 沈澱物을 0.5 mM histidine-imidazole buffer에 부유하여 精製된 赤血球膜 成分을 얻었다.

### 3. 試驗管 內에서 methanethiol 溶液에 依한 원주 赤血球 脆弱性檢査

Methanethiol에 對한 원주 赤血球의 溶血性 檢査는 鄭과 尹의 方法<sup>12)</sup>에 따라 實施하였다. 즉 0.9% NaCl 5 ml의 等張溶液에 methanethiol을 各各의 試驗管에 0.12, 0.18, 0.24, 0.30, 0.42 mg/ml 含有토록

첨가하였으며, methanethiol을 넣지 않은 0.9% NaCl 용액을 음성對照로, 蒸溜水만 넣은 것을 溶血陽性對照로 하였다. 여기에 흰쥐 全血 0.05 ml 씩을 각각 가한 후 모든 試驗管을 室溫에서 60分間 방치한 다음 1,500 rpm으로 5分間 遠心分離한 후 上層液을 540 nm에서 분광광도계를 이용하여 吸光度를 測定하였다. 溶血의 정도표시는 陽性對照 試驗管의 吸光度에 對한 各各 試驗管에 있어서 溶血된 色度の 吸光度를 百分率로 표시하였다.

#### 4. 赤血球恒數測定

血液學的 檢査는 heparin으로 처리된 血液을 Cellect model 8(Techoland Co. made in USA)을 이용하여 檢査하여 赤血球數, hemoglobin, hematocrit를 測定하여 赤血球恒數를 계산하였다.

#### 5. 實驗動物의 體重當 各 臟器의 무게測定

Methanethiol 投與 4時間 후 處置하여 各 臟器를 摘出하였다. 摘出した 臟器는 生理食鹽水로 가볍게 씻은 후 여지상에서 各 臟器에 남아있는 生理食鹽水를 可能한한 모두 除去한 다음 各 臟器의 무게를 秤量하였다. 평량한 各 臟器의 무게를 해당되는 實驗動物의 體重으로 나눈 후 百分率로 表示하였다.

#### 6. 燐脂質의 定量

精製 分離된 赤血球膜 中の 燐脂質 定量은 Iatron kit를 사용하여 測定하였다. 즉 試料 一定量에 酵素 試藥을 가한 후 發色된 赤色調를 波長 500 nm에서 吸光度를 읽고 檢량선에 準해 定량하였다. 燐脂質의 含量은 赤血球 1個當 mg으로 表示하였다.

#### 7. 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等の 方法<sup>14)</sup>에 準하였다.

#### 8. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 活性度 測定

赤血球膜의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性度는 膜分割에 存在하는 ATPase가 ATP를 加水分解하여 遊離되는 無機燐을 測定하는 Rangaraj 等の 方法<sup>15)</sup>에 準하였으며 이때 遊離되는 無機燐 定量은 Fiske-Subbarow法<sup>16)</sup>에 依하였다. ATPase 活性單位는 赤血球膜 蛋白 1mg이 1時間동안 遊離시키는 無機燐의 量을 nmole로 表示하였다.

### III. 實驗結果

#### 1. 試驗管内에서 methanethiol이 흰쥐 赤血球의

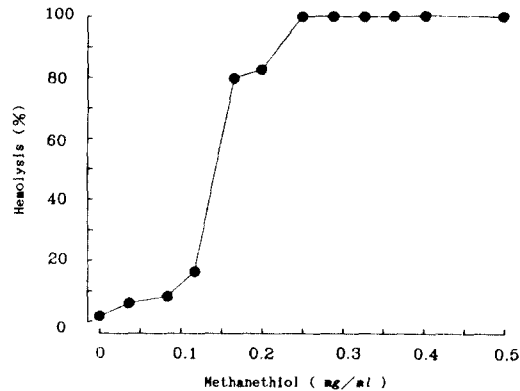


Fig. 1. Effect of methanethiol on the osmotic fragility of rat's erythrocyte. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments.

#### 溶血성에 미치는 影響

生理食鹽水로 調製한 等張性 methanethiol 溶液을 一定量의 흰쥐 赤血球가 들어있는 試驗管에 添加濃度를 달리하면서 溶血 程度를 檢討한 成績이 Fig. 1과 같다.

Methanethiol의 添加 濃度가 0.04 mg/ml에서 溶血이 시작되어 0.14 mg/ml까지는 溶血이 漸進적으로 增加를 보였으며, 0.20 mg/ml까지는 急激한 溶血을 나타내었고 0.24 mg/ml 이상의 濃度에서는 完全 溶血을 觀察할 수가 있었다.

#### 2. Methanethiol 投與에 따른 흰쥐 赤血球恒數의 變動

Methanethiol 投與群 및 對照群으로부터 採血한 血液으로 RBC count, hemoglobin 및 hematocrit를 測定한 후, 이들을 赤血球恒數로 換算한 것이 Table 2이다.

Methanethiol 投與群의 MCV值가  $67.47 \pm 2.70 \mu^3$ 이고, 對照群의 MCV值가  $60.0 \pm 0.52 \mu^3$ 로 methanethiol 投與群에 比하여 約 12%程度 增加되는 傾向이 觀察되었다.

#### 3. Methanethiol 投與에 따른 흰쥐 體重當 各 臟器의 무게變動

흰쥐 體重當 各 臟器의 무게變動의 百分率을 나타낸 것은 Table 3과 같다.

各 臟器의 對照群에 있어서는 肝臟은  $3.79 \pm 0.11$ , 腎臟은  $0.68 \pm 0.027$ , 脾臟은  $0.56 \pm 0.04$ , 心臟은  $0.34 \pm 0.01\%$ 이었으며, methanethiol 投與로 인한 各 臟

**Table 2.** Hematological findings in methanethiol-treated rats

Indices Groups	RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	Hb. (g/dl)	Hct. (%)	MCV ( $\mu^3$ )	MCH ( $\mu\text{g}$ )
Control	7.375 $\pm$ 0.379	14.40 $\pm$ 0.740	44.10 $\pm$ 2.165	60.00 $\pm$ 0.52	19.68 $\pm$ 0.42
Methanethiol	7.820 $\pm$ 0.334	16.00 $\pm$ 0.835	49.82 $\pm$ 2.597	67.47 $\pm$ 2.70*	20.43 $\pm$ 0.85

Each value represents the mean $\pm$  S.E. for 6 rats.

\*p<0.05.

**Table 3.** Effect of methanethiol treatment on the changes of organ weight per body weight (%) in rats

Groups	Organs	Liver	Kidney	Spleen	Heart
Control		3.79 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.027	0.56 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.01
Methanethiol		3.73 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.020	0.72 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.01

Values are mean $\pm$  S.E. of 6 animals.

**Table 4.** The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity, protein and phospholipid contents in each purification procedure of rats erythrocyte membrane

Procedure	Preparation	Protein (mg $\times 10^{-10}$ RBC)	Phospholipid (mg $\times 10^{-10}$ RBC)	Specific activities (nmoles pi/hr/mg of protein)
1. Hemolysis	Whole hemolysate	294.80	19.95	0.013
2. First centrifugation (20,000 $\times$ g for 15 min)	Precipitate	43.03	8.05	0.041
3. Washing with 10 mM EDTA	Precipitate	8.21	3.87	0.169
4. Washing with 0.5 M NaCl	Precipitate	8.49	3.30	0.232
5. Final washing	Final fraction	4.18	0.98	0.350

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean for 5 separate experiments.

**Table 5.** The protein and phospholipid contents in erythrocyte membrane of methanethiol-treated rats

	Protein (mg $\times 10^{-10}$ /RBC)	Phospholipid (mg $\times 10^{-10}$ /RBC)
Control	4.200 $\pm$ 0.031	0.950 $\pm$ 0.057
Methanethiol	3.009 $\pm$ 0.567	0.923 $\pm$ 0.087

The assay procedure was described in the experimental methods.

Each value represents the mean $\pm$  S.E. of 6 rats.

기의 무게에 있어서는 肝, 腎臟 및 心臟은 對照群과 別다른 變動들 觀察할 수 없었으나 脾臟은 對照群에 比하여 約 29% 程度 增加되었다.

#### 4. 흰쥐 赤血球膜 分離精製 過程中 分割別 蛋白質, 磷脂質 含量 및 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性變動

흰쥐에 methanethiol을 投與한 다음 赤血球膜을 分離精製하는 過程中 各 分割別 蛋白質과 磷脂質의 含量 및 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 活性變動을 觀察한 成績은 Table 4이다.

蛋白質과 磷脂質의 含量은 精製段階를 거침에 따라 蛋白質 및 인지질은 첫단계에 比해 현저하게 減少되었으나, 赤血球膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 活性은 이와 반대로 精製過程을 거침에 따라 처음 段階인 溶血過程에서 보다 約 28倍 程度 增加되었다.

#### 5. Methanethiol 投與後 分離精製된 赤血球膜의 蛋白質과 磷脂質 含量變動

흰쥐에 methanethiol을 投與한 후, 분리정제된 赤血球膜에서의 蛋白質과 磷脂質의 含量變動은 Table 5와 같다.

對照群에서의 蛋白質 含量은 4.20 $\pm$  0.031, 磷脂質은 0.950 $\pm$  0.057이었으며 methanethiol 投與로 蛋

**Table 6.** Effect of methanethiol administration on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of erythrocyte membrane in rats

Treatment	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase <sup>#</sup>
Control	0.350 ± 0.047
Methanethiol treated	0.144 ± 0.050***

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E. for 6 animals.

<sup>#</sup>Unit: nmole pi/mg of protein/min

\*\*\*p < 0.001.

**Table 7.** Effect of preincubation on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of rats erythrocyte membrane with methanethiol *in vitro*

Preincubation time (min)	0	15	30	45	60
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase activity (%)	100	116	134	77	66

Each value is the mean of 3 experiments.

Each enzyme activity was determined with the enzyme preparation preincubated with methanethiol.

A mixture of rats erythrocyte membrane (3.009 mg/ml of protein) with the methanethiol (0.01 mg/ml) was preincubated at 37°C in the various time described as above.

白質含量은 約 28% 減少되었으며 磷脂質은 對照群과 別다른 차이를 볼 수 없었다.

#### 6. 赤血球膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性에 미치는 methanethiol의 影響

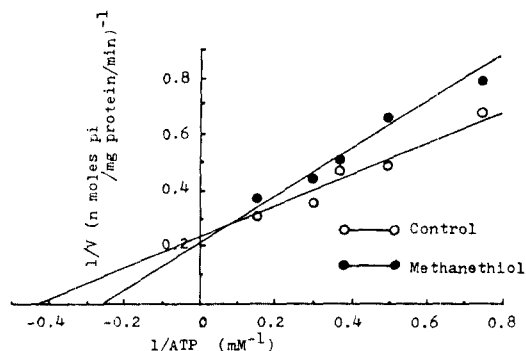
흰쥐 赤血球膜의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性에 미치는 methanethiol의 觀察한 成績이 Table 6이다.

對照群의 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 活性度는 0.350 ± 0.047이었으며 methanethiol 投與群은 對照群에 比하여 約 60%의 유의한(p < 0.001) 減少를 보였다.

#### 7. Preincubation time에 따른 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性에 미치는 methanethiol의 影響

흰쥐 赤血球膜 分劃(3.009 mg/ml)과 methanethiol (0.01 mg/ml)을 試驗管 內에서 混合하여 이 混合液을 37°C에서 經時別로 preincubation시킨 다음, 이 反應液을 酵素源으로 하여 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性變動을 觀察한 成績이 Table 7이다.

Preincubation 時間을 增加시키기에 따라 30분까지는 活性이 增加되었으나 以後 그 活性은 오히려 減少하여 60分에는 約 34% 程度 減少되었다.



**Fig. 2.** Double reciprocal plots of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in the rat erythrocyte membrane. The reaction mixture (1.5 ml) contained 0.5 mM histidine buffer (pH 7.0), 67 mM NaCl, 13.3 mM KCl, 0.33 mM EDTA, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>, enzyme solution and various concentration of ATP. Enzyme solution: The mixture of 0.07% methanethiol and erythrocyte membrane; protein (2.847 mg/ml) (1 : 1) was preincubated at 37°C for 60 min and then 0.1 ml of preincubated enzyme preparation was used. Data points represent means for 3 experiments.

#### 8. 赤血球膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 反應速度

赤血球膜에 methanethiol을 添加시킨 것과 methanethiol을 添加시키지 않은 것을 각각 37°C에서 60分間 preincubation시킨 다음 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 酵素源으로 하여 ATP 基質 濃度를 變動시킨 다음 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 活性을 測定하여 reciprocal plot를 나타낸 것이 Fig. 2이다. Methanethiol을 첨가시킨 酵素의 K<sub>m</sub>値는 4 mM이었으나 對照 試驗에서는 2.2 mM K<sub>m</sub>値를 나타내어 methanethiol 첨가한 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase의 K<sub>m</sub>値는 對照試驗에 比하여 約 2倍의 增加를 보였다. 한편 V<sub>max</sub>値는 methanethiol 處理試驗과 對照試驗 사이에서 別다른 差異를 볼 수 없었다.

#### IV. 考 察

Methanethiol에 依한 흰쥐 赤血球의 溶血 現象을 檢討코자 試驗管 內에 methanethiol의 添加濃度를 增加시켜 가면서 觀察하였을 때 0.24 mg/ml에서 100% 溶血을 일으켰다. 이와 같은 成績은 鄭과 尹<sup>12)</sup>의 人赤血球를 對象으로한 實驗結果와 類似的한 것으로서 methanethiol이 溶血作用을 나타내는 한 要因임을 알 수 있었다. 한편 本 實驗에서 흰쥐에 methane-

thiol을 投與하였을 때 溶血時 그 무게가 增加된다는 脾臟<sup>17)</sup>의 重量이 生理食鹽水만 注射한 對照群에 比하여 增加됨이 觀察되었다. 따라서 本 實驗結果와 鄭과 尹<sup>12)</sup>의 報告를 고려해 볼 때 methanethiol은 試驗管 내에서 뿐만 아니라 生體 内에서도 溶血과 관련이 있음을 시사해 주고 있다.

이러한 溶血現象을 血液學的 側面에서 檢討하고자 methanethiol을 投與한 實驗動物로부터 採血하여 赤血球恒數를 測定하였을 때 methanethiol 投與群이 對照群에 比하여 平均 赤血球容積(MCV)이 增加하는 傾向을 보였다. 이러한 現象은 methanethiol이 細胞膜의 物質移動에 異常을 일으킴으로써 나타난 結果로 思料되어지며, 한편 細胞膜에서 物質移動에 중요한 역할을 遂行하는 것으로 알려져 있는 膜蛋白質<sup>10)</sup>의 含量은 methanethiol 投與로 赤血球膜 蛋白質 含量이 減少되어 細胞膜의 物質移動에 障礙가 若起되었음을 알 수가 있다.

일반적으로 細胞體積의 조절은 膜蛋白質인  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase가 遂行<sup>10, 11)</sup>하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 methanethiol 投與에 依한 細胞膜 物質移動 障礙와 관련된 溶血現象이  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性變動과 關聯되는지를 檢討하였을 때 methanethiol을 實驗動物에 投與하므로  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性이 對照群에 比하여 현저히 減少되었다.

이와 같은 結果는 methanethiol에 의한 赤血球 溶血 현상이  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性變動과 관련됨을 시사해 주고 있다. 그러므로 이에 대한 機轉을 究明하고자 부분정제한 흰쥐 赤血球膜에 methanethiol 一定量을 添加시킨 다음 37°C에서 經時別로 preincubation시킨 후  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性을 測定한 結果, preincubation 時間에 따라 dual effect를 觀察할 수 있었으며, 本 實驗結果는 鄭이 尹<sup>12)</sup>의 人 赤血球  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase에 대한 methanethiol의 結果와 類似하였다. 따라서 鄭과 尹<sup>12)</sup>의 報告와 本 實驗結果를 고려해볼 때 methanethiol이  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 酵素蛋白의 構造變化에 影響을 미칠 것을 암시해 주고 있다.

한편 methanethiol에 依한  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性變動이 酵素蛋白構造 變化에 따른 것인지를 糾明하기 위한 一環으로 흰쥐 赤血球膜을 部分精製하여 methanethiol을 첨가시킨 후, ATP 基質含量에 따른 反應速度的인 側面에서 ATPase 酵素活性을 觀察하였을 때 methanethiol 첨가로 對照值에 比하여  $V_{\max}$ 值는 두 시험치간에 별다른 차를 볼 수 없었으나,  $K_m$ 值는 約 2倍 程度 增加되었다. 그러므로 methanethiol에 의한 赤血球膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase

活性 抑制 現象은 酵素蛋白의 3次 構造變化에 起因되어 나타난 것으로 생각되어진다.

以上の 實驗成績과 文獻上的 知見을 綜合하여 볼 때 methanethiol은 赤血球膜을 損傷시켜 赤血球를 溶血시키는 한 因子로 作用함을 알 수 있으며 이는 methanethiol이 赤血球膜의  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 酵素蛋白의 構造變形을 誘導시켜 物質移動에 變動이 招來되어 나타난 結果로 생각된다.

## V. 要約 및 結論

Methanethiol이 赤血球膜 損傷에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위한 一環으로 試驗管 내에서 methanethiol이 흰쥐 赤血球에 대한 용혈성 與否를 觀察함과 동시에 methanethiol을 흰쥐에 投與한 후 赤血球恒數를 측정하는 한편 赤血球膜을 部分精製한 후  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性을 測定하였다. 또한 精製한 赤血球膜에 methanethiol을 첨가시킨 후 37°C에서 preincubation시킨 후 本 酵素의 活性을 측정한 후 基質濃度를 변경시켜 가면서 反應速度를 관찰하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

試驗管 내에서 methanethiol의 단계별 농도에 흰쥐 赤血球 첨가시에 methanethiol 濃度 0.24 mg/ml 以上에서 완전 용혈이 관찰되었다.

흰쥐에 methanethiol을 投與한 후 赤血球恒數를 測定하였을 때 MCV值가 대조군에 比하여 增加하는 경향을 보였으며, 이때 脾臟의 무게가 대조군 보다 유의하게 증가되었다. 또한 赤血球膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 활성이 유의하게 감소되었으며 methanethiol과 정제된 赤血球膜을 37°C에서 시켰을 때 역시  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 활성이 증가된 후 감소되는 dual效果를 보였으며  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase의  $K_m$ 치는 대조치보다 約 2倍 증가되었다.

以上 실험결과를 종합하여 볼 때 methanethiol에 의한 赤血球膜 損傷은 methanethiol이  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 효소 단백질에 영향을 미쳐 나타난 結果로 생각된다.

## 參考文獻

- 1) Rose, V. E. : Thiols in "Encyclopaedia of Occupational Health and Safety" (edited by Parmeggiani, L.), Vol. 2, pp.2172-2173, International Labour Office Geneva, 1983.
- 2) Blom, H. J., Jacintha, P. A. M., Yap, S. H. and Tangerman, A. : Methanethiol and dimethylsul-

- fide formation from 3-methylthio-propionate in human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **972**, 131136, 1988.
- 3) Nichol, D. L., Shaw, M. K. and Ledword, D. A. : Hydrogen sulfide production in prepacked chilled beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, **19**, 937-939, 1970.
  - 4) Freeman, L. R., Silverman, G. T., Angelini, P. *et al.* : Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 222-231, 1976.
  - 5) Stetten, P. : Formation of volatile sulfur compounds in fermenting wort and their resorption by means of carbon dioxide. *Nahrung.*, **15**, 71-79, 1971.
  - 6) Kirk, E. : The quantity and composition of human colonic flatus. *Gastroentrol.*, **12**, 782-794, 1949.
  - 7) Sogaard, H. : Hydrogen sulfide producing variants of *Escherichia coli*. *Acta Vet. Scand.*, **16**, 31-38, 1975.
  - 8) Zieve, L., Doizaki, W. M. and Zieve, F. J. : Synergism between the mercaptans and ammonia or fatty acids in the production of coma: A Possible role for mercaptans in the pathogenesis of hepatic coma. *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 16-28, 1974.
  - 9) Finkelstein, A. and Benevenga, N. J. : The effect of methanethiol and methionine toxicity on the activities of cytochrome c oxidase and enzymes involved in protection from peroxidative damage. *J. Nutr.*, **116**, 204-215, 1986.
  - 10) Ganong, W. F. : The general and cellular basis of medical physiology in "Review of Medical Physiology" (13th edition) pp.1-33, Appleton and Lange, 1987.
  - 11) Jacob, H. S., Jandl, J. H. and Files, N. M. : Increased cell membrane permeability in the pathogenesis of hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.*, **43**(8), 1704-1720, 1964.
  - 12) 鄭昭雄, 尹鍾國 : 試驗管 내에서 Methanthiol이 人赤血球膜의  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 活性에 미치는 影響. 계명대학교 기초과학 연구논집. **8**(1), 61-66, 1989.
  - 13) Rosenberg, S. A. and Guidotti, G. : The protein of human erythrocyte membrane I. Preparation, solubilization, and characterization. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1985, 1968.
  - 14) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
  - 15) Rangaraj, N. and Kalant, H. : Interaction of ethanol and catecholamines on rat brain ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, **57**(10), 1098-1106, 1979.
  - 16) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400, 1925.
  - 17) Cotran, R. S., Kumar, V. and Robbins, S. L. : Diseases of red cells and bleeding disorder "in Robbins Pathologic Basis of Disease" (4th edition) pp.657-702, W. B. Saunders Co., 1989.