

# 흰쥐 신장 Microsomal fraction ATPase 활성에 대한 연구\*\*

## Studies on ATPase Activity of Rat Kidney Microsomal Fraction

서울대학교 의과대학 약리학교실

박 찬 응·오 진 섭·문 익 주\*

### I. 서 론

세포내외의 이온 평형을 위하여 그리고 세포에서의 여러가지 생리적 현상 유지를 위하여 세포막을 통한 이온 이동이 일어나고 있음은 잘 알려진 사실이다.

1953년 Schatzman<sup>1)</sup>이 적혈구 세포막을 통한 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 이동이 일어났음을 관찰한 이래 이같은 이온 이동이 Na<sup>+</sup> 또는 K<sup>+</sup>에 의하여 활성화하는 ATPase에 의하여 얻어지는 에너지를 이용한 능동적 이동이 일어난고 있음을 Skou<sup>2)3)</sup>가 규명하는데 이어 여러 학자들에 의하여 너<sup>4)5)6)</sup> 적혈구<sup>7)8)</sup> 간<sup>9)</sup> 그리고 장<sup>10)</sup> 및 신장<sup>11)</sup> 세포막에서 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 능동적 이동에 관여하는 ATPase가 존재함을 증명하였다. 이같은 현상은 특히 적혈구 세포막을 이용한 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 능동적 이동에 관하여 잘 증명되고 있으며 이 ATPase 활성은 강심 배당체인 ouabain에 의하여 억제됨을 나타내고 있으며<sup>7)8)12)</sup> 이와같은 효소계가 심장 microsomal fraction에도 존재함이 알려졌다.<sup>13)14)15)16)</sup>

신장은 세뇨관에서의 이온 교환에 의하여 또는 Na<sup>+</sup> 재흡수 기전을 통하여 생체내 수분 및 전해질 평형을 조절하는 가장 중요한 장기임은 사실이다. ethacrynic acid 및 furosemide는 신 세뇨관에서의 특히 loop of Henle의 상행지에서의 Na<sup>+</sup>재흡수를 억제함으로써<sup>17)18)</sup> 강력한 이뇨효과를 나타내는 약물로 알려졌다.

이에 저자들은 이들 이뇨제가 신 세뇨관에서의 Na<sup>+</sup> 재흡수에 필연적으로 관여할 것으로 생각되는 신장 microsomal ATPase 활성에 어떤 영향을 미치는가를 검토코저 흰쥐 신장 microsomal fraction의 ATPase 활성에

대한 Ethacrynic acid, Furosemide 및 ouabain의 영향을 관찰하여 그 성적을 보고하는 바이다.

### II. 실험 재료 및 방법

#### 1) Microsomal fraction 분리

체중 200gm 내외의 건강한 흰쥐를 성의 구별없이 단 두 처사시켜 신장을 적출하고 Paul W. Davis<sup>19)</sup>의 방법으로 microsomal fraction을 분리하였다. 즉 적출한 신장은 5 mM EDTA, 0.1% deoxycholic acid, 30 mM Tris-HCl(pH 7.5)를 함유하는 8 vol.의 냉각된 0.25 M sucrose 용액에서 잘게 썬 다음 Teflon homogenizer로 400 rpm으로 열번 homogenize하여 12,000xg로 30분간 원심분리하고 상등액을 조심스럽게 따루어 35,000xg로 30분간 원침하여 얻은 잔사를 원래의 homogenizing medium에 부유시켜 35,000xg로 30분 원침하여 얻어진 잔사를 microsomal fraction으로 사용하였다. 이상의 조작은 0°C에서 행하였으며 얻어진 microsomal fraction의 양은 담백함량을 기준하였다.

담백질함량은 Biuret 방법에 의하여 측정하였다.

#### 2) ATPase 활성도 측정

각 반응액은 Tris-ATP 3mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, NaCl 100mM, KCl 15 및 5mM, Tris-HCl 30mM(pH 7.5)로 하고 0.2ml의 microsomal fraction을 가하여 총량 2.0 ml가 되게 한다음 37°C 수욕조중에서 15분간 반응시켜 유리되는 무기인(Pi)을 측정하여 ATPase 활성도를 측정하였으며 Mg<sup>++</sup>-ATPase 활성도는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup> 대신에 115mM choline을 함유하는 반응액에서 유리되는 무기인을 측정하여  $\mu\text{mole Pi/mg protein/hr.}$ 로 각각 표시하였다.

유리된 무기인의 측정에는 Horwitz<sup>20)</sup>의 Stannous chlo-

\* 서울대학교 의과대학 비기노과학교실

\*\* 본연구는 1971년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 수행되었음.

ride 법으로 측정하였다.

실험에서 사용된 ATP 및 Tris-salt 는 Sigma 제품을 사용하였고 기타 일반시약도 시약용 순품을 사용하였다

### III. 실험 결과

#### 1) 흰쥐 신장 microsomal fraction ATPase 활성

흰쥐 신장에서 분리한 microsomal fraction 의 ATPase 활성은 Fig. 1에서와 같이 반응액중 단백질량이 증가함에 따라 상승함을 나타내었고 Table 1, Table 2에 나타난 바와 같이 K<sup>+</sup>농도가 높은 경우 K<sup>+</sup>농도가 낮은 때보다 높은 활성을 나타내었으며 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>을 제거하였을때

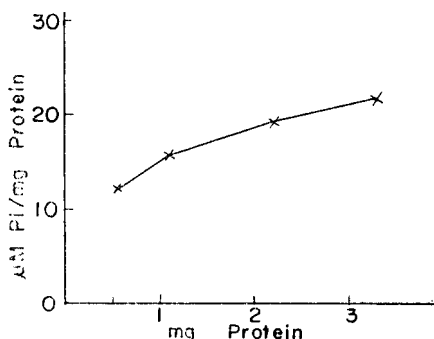


Fig. 1. Effect of protein content on kidney microsomal fraction ATPase activity.

Medium contain 3mM Tris-ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mM Na<sup>+</sup>, 15mM K<sup>+</sup>, 30mM Tris-HCl(pH 7.5)

현저한 활성의 감소를 보이기는 하나 Mg<sup>++</sup>에 의한 소위 Mg<sup>++</sup>-activated ATPase 활성을 나타내고 있다.

#### 2) 흰쥐 신장 microsomal fraction ATPase 활성에 대한 Ethacrynic acid의 영향

Ethacrynic acid 는 Table 1에서와 같이 각 농도에서 microsomal fraction ATPase 활성을 유의하게 억제하였으며 Mg<sup>++</sup>-ATPase 활성도 역시 억제함을 나타내었고 Fig. 2에서 보이는 바와 같이 ATPase 활성의 억제도는 약물의 농도가 증가함에 따라 더 현저함을 보여주나 Mg<sup>++</sup>-ATPase 활성에는 농도에 따르는 유의한 차이는 인정할 수 없었다. 또 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 K<sup>+</sup>농도가 낮은 5mM 의 반응액에서도 역시 ethacrynic acid

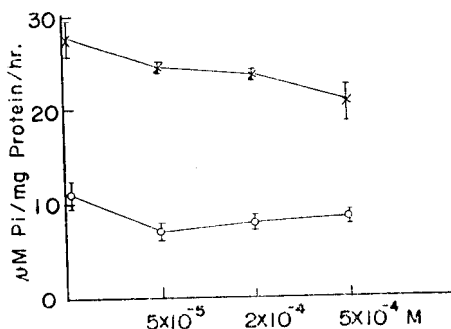


Fig. 2. The effect of ethacrynic acid on ATPase activity of kidney microsomal fraction.

Medium consist of 3mM Tris-ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mMNa<sup>+</sup>, 15mM K<sup>+</sup>, 30mM Tris-HCl(pH7.5) (x-x) choline 115mM instead of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> (o-o)

Table 1. The ATPase activity of kidney microsomal fraction.

Na<sup>+</sup> 100mM, K<sup>+</sup> 15mM, Tris-ATP 3mM, Mg<sup>++</sup> 3mM, Tris-HCl 30mM (pH7.5). Mg<sup>++</sup>-ATPase activity; 115mM choline in place of omitted Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>.

Drugs	Concentration	ATPase activity µM Pi/mg protein/hr.	P value	Mg <sup>++</sup> -ATPase activity µM Pi/mg protein/hr.	P value
None		27.61±2.25		11.13±1.86	
Ethacrynic acid	5×10 <sup>-5</sup>	24.55±0.16	<0.001	7.14±0.97	<0.001
	2×10 <sup>-4</sup>	23.47±0.18	<0.001	7.93±0.25	<0.001
	5×10 <sup>-4</sup>	20.59±2.58	<0.001	8.51±0.69	<0.001
Furosemide	5×10 <sup>-5</sup>	27.94±0.30	<0.6	12.36±0.97	<0.02
	2×10 <sup>-4</sup>	30.48±0.22	<0.001	13.04±0.82	<0.01
	5×10 <sup>-4</sup>	23.51±1.85	<0.001	10.21±0.56	<0.2
	1×10 <sup>-3</sup>	21.21±0.55	<0.001	6.93±0.38	<0.001
Ouabain	5×10 <sup>-7</sup>	26.44±1.08	<0.05	9.14±0.68	<0.001
	2×10 <sup>-6</sup>	28.41±0.63	<0.2	10.23±0.37	<0.05
	5×10 <sup>-6</sup>	26.84±2.68	<0.4	10.00±0.83	<0.05

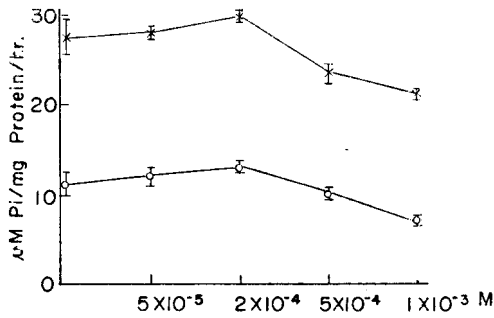


Fig. 3. The effect of Furosemide on ATPase activity of kidney microsomal fraction. Medium consist of 3mM Tris-ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mM Na<sup>+</sup>, 15mM K<sup>+</sup>, 30mM Tris-HCl(pH7.5) (x-x) choline 115mM instead of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> (o-o)

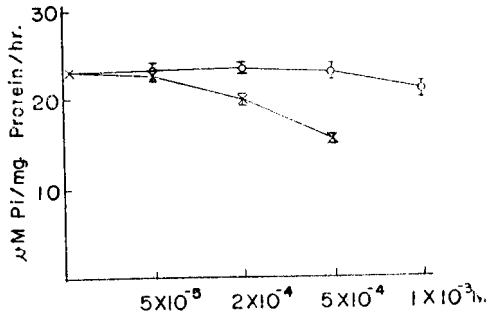


Fig. 4. The effect of Ethacrynic acid(x-x) and Furosemide(o-o) on ATPase activity of kidney microsomal fraction. medium contain 3mM Tris-ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mM Tris-HCl(pH 7.5)

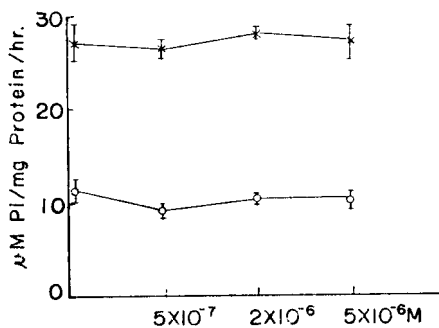


Fig. 5. The effect of ouabain on ATPase activity of kidney microsomal fraction. Medium consist of 3mM Tris-ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mM Na<sup>+</sup>, 15mM K<sup>+</sup>, 30mM Tris-HCl(pH 7.5) (x-x) 115mM choline instead of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> (o-o)

Table 2. The ATPase activity of kidney microsomal fraction in the medium contain 5mM K<sup>+</sup>.

Drugs	Concentration	ATPase activity μM Pi/mg protein/hr.	P value
None		23.01±0.14	
Ethacrynic acid	5×10 <sup>-5</sup>	22.89±0.25	<0.4
	2×10 <sup>-4</sup>	20.04±0.45	<0.001
	5×10 <sup>-4</sup>	15.45±0.47	<0.001
Furosemide	5×10 <sup>-5</sup>	23.83±0.37	<0.6
	2×10 <sup>-4</sup>	23.81±0.26	<0.6
	5×10 <sup>-4</sup>	23.17±0.89	<0.6
	1×10 <sup>-3</sup>	20.96±0.75	<0.001

의 농도가 증가함에 따라 그 억제 효과가 심해지는 것을 볼 수 있었다.

### 3) 흰쥐 신장 microsomal fraction ATPase 활성에 대한 Furosemide의 영향

Table 1, 및 Table 2에서와 같이 furosemide는 K<sup>+</sup> 농도 15mM에서 ATPase 활성에 대하여 5×10<sup>-4</sup> 이상의 농도에서 현저한 억제를 보이거나 2×10<sup>-4</sup> 이하의 농도에서는 오히려 증가됨을 나타내었다(Fig. 3). K<sup>+</sup> 농도 5mM에서는 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 ATPase 활성에 별 영향을 관찰할 수 없었으며 1×10<sup>-3</sup>에서만 유의한 억제가 일어났음을 관찰하였다.

### 4) 흰쥐 신장 microsomal fraction ATPase 활성에 대한 Ouabain의 영향

Ouabain은 Table 1에서 보이는 바와 같이 ATPase 활성에 별 영향을 보이지 않았으나 Mg<sup>++</sup>-ATPase 활성에 대하여는 실험한 각 농도에서 유의한 억제가 있었고 Fig. 5에 보이는 바와 같이 5×10<sup>-7</sup>에서 더 현저함을 보였다.

## IV. 고 찰

신장 microsomal ATPase도 최근에 이르러 타 조직 세포막 ATPase에서와 같이 여러 학자들에 의하여 광범한 연구가 진행되고 있다. 특히 신장은 왕성한 이온 교환과정을 통하여 이노작용을 수행하는 기관으로서 이에 따르는 에너지 대사의 일환을 차지하는 ATPase의 역할은 무엇보다 중요하다.

李<sup>21)</sup>는 토끼 신장 microsomal fraction이 ATP를 분해하여 무기인을 유리함을 토대로 ATPase의 존재를 확인하면서 이 ATPase는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>에 의하여 활성화되고 Mg<sup>++</sup>의 존재 없이는 그 활성이 나타나지 않음을

관찰 보고한바 있다. 또한 신장 microsomal fraction의 ATPase를 NaF 및 IAA 또는 DNP 및 NaCN과 같은 당대사에 영향을 미치는 약물을 이용하여 그 성질의 일단을 구명한바 있다.

본 실험에서도 흰쥐 신장에서 분리한 microsomal fraction은 ATP를 분해하여 무기인을 유리시켰으며 담백량의 증가에 따라 유리되는 무기인의 양이 증가됨을 보았고 역시  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 에 의하여 현저히 활성화되었다.

Post등<sup>21)</sup> 및 Dunham 및 Glyun<sup>8)</sup> 등 외에 여러학자들은 적혈구 세포막에서 ATPase 활성이 ouabain에 의하여 현저히 억제됨을 보고하였고 Rawson 및 Pincus<sup>22)</sup>는 흰쥐 뇌의 microsomal fraction에서  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase는 ouabain에 의하여 별 영향을 받지 않는다고 하였으며 朴<sup>12)</sup>도 흰쥐 적혈구 세포막 ATPase의 ouabain에 대한 영향을 관찰한 보고에서 ouabain은 적혈구세포막  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase를 억제하고  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase에는 영향이 없었음을 보고한바 있다.

본 실험에서 신장 microsomal fraction에 대하여 ouabain은 ATPase 활성에 별 영향이 없거나 오히려 약간 상승하는 결과를 나타내었으며  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 활성을 억제하였으며 이같은 현상은 저농도에서 더 현저하였다 Palmer<sup>23)</sup> 등도 토끼와 닭의 신장에서 분리한 microsomal ATPase가 ouabain에 의하여 자극 및 억제됨을 보고하였고 이같은 ATPase 활성의 자극은 저농도에서 관찰되고 신장 microsomal ATPase에는 ouabain에 대한 두가지 수용체가 존재함을 주장하였고 이같은 자극과 억제의 한계농도는  $10^{-7}\text{M}$ 로 보고하였다.

본실험 결과에서도  $10^{-6}\text{M}$ 에서는 별 영향을 인정할수 없었으나  $10^{-7}\text{M}$ 에서 약간의 상승 경향을 보이고 있다.

한편 Allen 등<sup>24)</sup>은 개의 신장에서 ouabain은 ATPase 활성을 억제하며 그 억제작용은 시간에 크게 관계됨을 관찰하고  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase 활성의 억제가 ouabain의 이노효과의 원인이 될것으로 생각된다고하여 수용체설보다는 시간조건을 강조하고 있다.

Ethacrynic acid는 우수한 이노효과를 나타내는 약물로서 1963년 Cannon 등<sup>25)</sup>에 의하여 소개된 이래 그 성질이 Beyer 등<sup>26)</sup>에 의하여 광범하게 검토되었다.

Ethacrynic acid는 정맥주사로 즉시 이노효과를 나타내며 한쪽 신동맥에 주사할때 편측성 이노효과를 나타내는 점으로 미루어 ethacrynic acid는 신장에 직접 작용하여 이노효과를 나타낼것으로 보고 뇨중 이온함량의 변동을 검토한바 중요 음이온으로는  $\text{Cl}^-$ 를 들수 있으며 이에 상당하는  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 의 배설이 일어남을 관찰하였

고 ethacrynic acid의 이노효과는 타 이노제와 달리 생체의 산-알카리 평형 변동에 영향을 받지 않으며 Carbonic anhydrase를 억제하지 않는다고 하였다. 그리고 Stop-flow 방법을 이용하여  $\text{Na}^+$ 의 재흡수가 현저하게 억제됨을 관찰하고 그 작용부위는 loop of Henle의 상행지에 해당될 것이라고 주장하였다.

Komorn 및 Cafruny<sup>27)</sup>는 한쪽 신장을 절제한 개에서 ethacrynic acid를 투여하였을때 나머지 신장 세포내에 protein bound sulfhydryl group이 현저하게 감소함을 관찰하고 ethacrynic acid의 이노효과는 신장 세포담백의 sulfhydryl group의 binding capacity와 밀접한 관계가 있을 것이라고 시사하였다. Earley 및 Friedler<sup>28)</sup>는 전해질 이동에 의하여 뇨의회석 및 농축을 조절하는데 가장 중요한 loop of Henle에 ethacrynic acid가 작용하여 saluresis 및 이노효과가 일어난다고 하였으며 Goldberg 등<sup>29)</sup>, Gussin<sup>17)</sup>, Cannon<sup>30)</sup> 등의 실험결과도 이와 같은 사실을 뒷바침해주고 있다.

한편 Duggen 및 Noll<sup>31)</sup>은 guinea-pig의 신장 microsomal fraction을 분리하고 ouabain에 민감한  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Mg}^{++}$ -ATPase를 증명하고 이 ATPase는 중금속, 강심배당제 그리고 ethacrynic acid와 유사한 구조를 갖는 일부 화합물에 의하여 억제됨을 보고하였으며 Charnock 등<sup>32)</sup>도 역시 신장 microsomal fraction의 ATPase 활성이 ethacrynic acid에 의하여 억제됨을 관찰하고 이는  $\text{K}^+$ 농도에 영향을 받는다고 하였다. 본 실험결과에서도 ethacrynic acid는 흰쥐 신장 microsomal fraction의 ATPase 활성을 현저하게 억제하였으며  $\text{K}^+$ 농도가 낮은 경우 억제 정도는 더욱현저함을 관찰하였다. Davis<sup>19)</sup>도 역시 ethacrynic acid가 신장 ATPase 활성을 억제하고 cystein과 같이 적용하여 cystein과 약물의 결합비의 증가정도와 약물의 ATPase 활성 억제정도가 비례함을 관찰하여 일찍이 Komorn<sup>27)</sup> 등이 주장한 ethacrynic acid의 ATPase 활성의 억제는 효소내의 sulfhydryl group과 밀접한 관계가 있음을 뒷바침하였다.

한편 1964년 Gayer<sup>18)</sup>에 의하여 새로운 이노제로서 소개된 furosemide도 역시 신세뇨관에 작용하여 전해질 재흡수를 억제하므로써 강력한 이노효과를 나타낸다고 하였다. Hook<sup>34)</sup> 등도 furosemide는 신장에 직접 작용하여 이노효과를 나타내며 이노효과는 생체 산-알카리 평형변동에 영향을 받지 않는다고 보고하고 Fraser 등<sup>35)</sup>은 free water clearance를 관찰하여 furosemide는 신장의 뇨농축기전에 작용하여 이노효과를 나타내며 작용부위는 부분적이나마 collecting duct의 수분에 대한 투과성 변화에 기인할것으로 추측하였다. Brenner 등<sup>33)</sup> 또한 furosemide는 loop of Henle 뿐 아니라 신장의 큰

위 세뇨관에 작용하여  $\text{Na}^+$  재흡수를 현저히 억제함을 관찰 보고하였다. 이상의 결과는 furosemide 도 ethacrynic acid 와 같이 신세뇨관에서의 이온이동기전에 작용할것을 암시하며 본실험 결과에서도 역시 furosemide 는 신장 microsomal ATPase 활성을 현저히 억제하며 고농도에서는 현저한  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 활성의 억제를 특히 나타내었다. 또 furosemide 의 신장 microsomal ATPase 활성에 대한 영향은  $\text{K}^+$  농도에 의하여 영향반응을 보여주고 있다. 즉  $\text{K}^+$  5mM에서 별로 현저한 억제가 일어나지 않음에 반하여 15mM에서 현저한 억제가 일어나고 있다.

이상의 결과와 여러학자들의 연구결과로 미루어 furosemide 도 역시 ethacrynic acid 와 같이 신장 microsomal ATPase 활성을 억제하므로써 신세뇨관에서의  $\text{Na}^+$ 의 재흡수를 억제하여 이뇨효과를 나타낼것으로 사료된다.

## V. 결 론

신세뇨관에서의 ethacrynic acid, furosemide 및 ouabain 의  $\text{Na}^+$  흡수기전의 일단을 밝히고져 흰쥐 신장 microsomal fraction ATPase 활성에 대한 영향을 관찰하였다.

Ethacrynic acid 는  $5 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-4}$  및  $5 \times 10^{-4}$ M 에서 각각 현저한 ATPase 활성의 억제를 보였고  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 활성은  $5 \times 10^{-5}$ M에서는 억제를 보이나  $2 \times 10^{-4}$  및  $5 \times 10^{-4}$ M에서는 억제되지 않았으며 ATPase 활성의 억제는 반응액중의  $\text{K}^+$  농도에 영향을 받았다.

Furosemide 는  $5 \times 10^{-4}$  및  $1 \times 10^{-3}$ M에서 현저한 ATPase 활성의 억제를 보였고  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 활성은  $1 \times 10^{-3}$ M에서만 억제를 보였으며 이같은 활성의 억제는  $\text{K}^+$ 농도가 낮은 5mM 반응액 중에서는 일어나지 않았다.

Ouabain 은  $5 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  및  $5 \times 10^{-6}$ M 각 농도에서 현저한 영향은 관찰할 수 없었으나 약간의 ATPase 활성 상승을 보였고  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase 활성의 억제를 나타내었다.

## ABSTRACT

### Studies on ATPase activity of rat kidney microsomal fraction.

Park, C. W., Oh, J. S. and Moon, J. C.

Department of Pharmacology, College of Medicine, S. N. U.

The effects of ethacrynic acid, furosemide and oua-

bain on ATPase activity of rat microsomal fraction were studied in order to confirm the evidence of relation between effect on ATPase activity and their diuretic action.

Ethacrynic acid and furosemide inhibit rat kidney microsomal ATPase activity and degree of their inhibitory action was dependent on  $\text{K}^+$  concentration in the medium.

Ouabain shows no inhibitory action on ATPase activity but slight stimulation.  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase activity was inhibited by ouabain.

It suggest that the inhibition of kidney microsomal ATPase activity by ethacrynic acid and furosemide will partly contribute to their diuretic action through inhibition of tubular sodium reabsorption mechanism.

## REFERENCES

- Schatzman, H. J. : *Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Eirythrocytenmembran. Helv. physiol. acta, 11; 346-354, 1953.*
- Skou, J. C. : *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta, 23; 394-401, 1957.*
- Skou, J. C. : *Preparation from brain and kidney of the enzyme involved in active transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . Biochim. Biophys. Acta, 58; 314-325, 1962.*
- Skou, J. C. : *Further investigation on  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  activated ATPase, possibly related to the active, linked transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  across the nerve membrane. Biochim. Biophys. Acta, 42;6-23, 1960.*
- Järnefelt, J. : *Sodium-stimulated adenosine-triphosphatase in microsome from rat brain. Biochim. Biophys. Acta, 48;104-112, 1961.*
- Aldridge, W. N. : *Adenosine triphosphatase in the microsomal fraction from rat brain. Biochem. J. 83;527-533, 1962.*
- Post, R. L., Merritt, C. R., Kinsolving, C. R. and Albright, D. D. : *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocytes. J. Biol. Chem., 235; 1796-1802, 1960.*
- Dunham, E. T. C. and Glynn, I. M. : *Adenosine*

- triphosphatase activity and the active movement of alkali metal ions. *J. Physiol.*, 156; 274-293, 1961.
9. Emmelot, P. and Bos, C. J. : Adenosine triphosphatase in the cellmembrane fraction from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 58; 374-375, 1962.
  10. Taylor, C.B. : Cation stimulation of an ATPase system from the intestinal mucosa of the guinea pig. *Biochim. Biophys. Acta*, 60; 437-440, 1962.
  11. Wheeler, K.P. and Whittam, R. : Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport. *Biochem. J.*, 85; 495-507, 1962.
  12. Park, C.W. : The effect of diphenylhydantoin and ouabain on ATPase activity in rat erythrocyte membranes. *Korean J. Pharmacol.*, 6; 1-7, 1970.
  13. Auditore, J.V. : Sodium-potassium activated gastrophanthin sensitive ATPase in cardiac muscle. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 110; 595-597, 1962.
  14. Lee, K.S. and Yu, D.H. : A study of the sodium and potassium-activated ATPase activity of heart microsomal fraction. *Biochem. Pharmacol.*, 12; 1253-1264, 1964.
  15. Schwartz, A. and Laseter, A. : A sodium and potassium stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissue. II. *Biochem. Pharmacol.* 13; 337-348, 1964.
  16. Schwartz, A. and Laseter, A. : A sodium and potassium stimulated adenosine triphosphatase from cardiac tissue. III. *Biochem. Pharmacol.* 13; 921-934, 1964.
  17. Gussin, R.Z. and Cafruny, E.J. : Renal sites of action of ethacrynic acid. *J. Pharmac. exp. Ther.* 153; 148-158, 1966.
  18. Gayer, J. : Die renale Exkretion des neuen Diureticum Furosemid. *Klin. Wschr.*, 43; 898-902, 1965.
  19. Davis, P.W. : Inhibition of renal  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid. *Biochem. Pharmacol.* 19; 1983-1989, 1970.
  20. Horwitt, B.N. : Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J. Biol. chem.* 193; 537-541, 1952.
  21. Lee, S.H. : Studies on the activity of microsomal ATPase of the rabbit kidney. *Korean J. Physiol.* 1; 141-149, 1967.
  22. Rawson, M.D. and Pincus, J.H. : The effect of diphenylhydantoin on sodium, potassium, magnesium-activated adenosine triphosphatase in microsomal fractions of rat and guinea-pig brain and whole homogenates of human brain. *Biochem. Pharmacol.* 17; 573-579, 1968.
  23. Palmer, R.F., Lasseter, K.C. and Melvin, S.L. : Stimulation of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  dependent adenosine triphosphatase by ouabain. *Arch. Biochem. Biophys.* 113; 629-633, 1966.
  24. Allen, J.C., Martinez-Maldonado, M., Eknoyan, G., Suki, W. N. and Schwartz, A. : Relation between digitalis binding in vivo and inhibition of sodium, potassium-adenosine triphosphatase in canine kidney. *Biochem. Pharmacol.* 20; 73-80, 1971.
  25. Cannon, P.J., Ames, R.P., and Laragh, J.H. : Methylenebutyryl phenoxyacetic acid. Novel and potent natriuretic and diuretic agent. *J. Amer. Med. Ass.* 185; 854-863, 1963.
  26. Beyer, K.H., Baer, J.E., Michaelson, J.K. and Russo, H.F. : Renotropic characteristics of ethacrynic acid: A phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. *J. Pharmac. exp. Ther.* 147; 1-22, 1965.
  27. Komorn, R. M. and Cafruny, E. J. : Ethacrynic acid: Diuretic property coupled to reaction with sulfhydryl groups of renal cell. *Science*, 143; 133-134, 1964.
  28. Earley, L.E. and Friedler, R.M. : Renal tubular effects of ethacrynic acid. *J. Clin. Invest.* 43; 1495-1506, 1964.
  29. Goldberg, M., McCurdy, D. K. Foltz, E.L. and Bluemle, L.W., Jr. : Effects of ethacrynic acid (a new saluretic agent) on renal diluting and concentrating mechanisms: Evidence for site of action in the loop of Henle. *J. Clin. Invest.* 43; 201-216, 1964.
  30. Cannon, P.J., Heinemann, H. O., Stason, W.B. and Laragh, J.H. : Ethacrynic acid. Effectiveness and mode of diuretic action in man. *Circulation*,

- 31; 5-18, 1965.
31. Duggan, D.E. and Noll, R.M. : *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex.* *Arch. Biochem. Biophys.* 109; 388-396, 1965.
32. Charnock, J. S., Potter, H. A. and McKee, D. : *Ethacrynic acid inhibition of(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-activated adenosine triphosphatase.* *Biochem. Pharmac.* 19; 1637-1641, 1970.
33. Brenner, B.M., Keimowitz, R.I., Wright, F.S. and Berliner, R.W. : *An inhibitory effect of furosemide on sodium reabsorption by the proximal tubule of the rat nephron.* *J. Clin. Invest.* 48; 290-300, 1969.
34. Hook, J.B. and Williamson, H.E. : *Influence of probenecid and alteration in acid-base balance of the saluretic activity of furosemide.* *J. Pharmac. exp. Ther.* 149; 404-408, 1965.
35. Fraser, A.G., Cowie, J.F., Lambie, A. T. and Robson, J.S. : *The effect of furosemide on the osmolality of the urine and the composition of renal tissue.* *J. Pharmac. exp. Ther.* 158; 475-486, 1967.
-