

납 이온이 토끼 적혈구의 포타슘 투과에 미치는 영향

The Effect of Lead Ion on the Potassium Transport of Rabbit Blood Cells

서울대학교 의과대학 생리학교실
<지도 남기용 교수>

부산대학교 의과대학 생리학교실
<지도 고일섭 조교수>

閔 建 植

다량의 중금속 이온을 적혈구에 작용하면 세포내의 포타슘 이온(K^+)이 유출되어 세포막 밖으로 나오며, 포타슘의 투과 이동은 얼마후에 평형에 도달하여 세포막 안팎의 농도 변화는 정지된다^{1,2)}. 중금속 이온은 화학적 친화력에 따라서 세포막에 있는 유효기와 특이적으로 결합하거나 때로는 세포막 안으로 들어가서 세포의 조성 물질과 반응한다. 세포막과 결합한 중금속 이온은 막의 기능에 변동을 일으키고 세포내에 들어가서는 세포의 호흡 작용에 영향을 미친다³⁾.

중금속 이온이 세포막의 작용기와 결합하는 기전은 간단하지 않으며 동물에 따라서 차이를 나타낸다. 수은 이온과 납(Pb)이온은 SH군과 화학적 친화력이 있어서 잘 결합하는데 수은 이온(Hg)은 이이스트(yeast)에 작용하여 포타슘의 세포 밖으로의 유출이 일어나나 납 이온의 작용에서는 이런 현상이 일어나지 않는다⁴⁾. 납 이온은 사람과 토끼 적혈구에 작용하여 포타슘 이온의 유출을 일으키지만, 말이나 돼지 적혈구에서는 일어나지 않으며 수은 이온은 이를 세포에 모두 작용하여 포타슘의 방출을 일으킨다^{1,2)}. 수은 이온은 사람 적혈구에서 SH 기와 결합하고 포도당의 세포내로의 투과 이동을 억제한다⁵⁾. 납 이온은 사람 적혈구막에 있는 SS기와 작용하여 포타슘의 상실을 일으키지만 토끼 혈구막과의 작용기는 보고된 바가 없다⁶⁾.

Henriques and Orskov⁷⁾는 토끼 적혈구에 납(Pb)이온을 작용시키면 소위 중독을 일으켜서 세포막의 일부가 손상되며 세포내의 포타슘 이온이 밖으로 유출되어 나오고 포타슘의 이동과 교환되는 현상으로 있어야 할 쏘듐 이온의 세포내로의 투과 이동은 일어나지 않는다고 하였다. Joyce, Moore and Weathrall¹⁾은 납, 수은,

금 이온 등을 토끼 적혈구에 작용시킨 실험에서 혈구내의 포타슘이 유출되는 것을 관찰하였으며 납 이온으로 중독을 일으킨 세포에서는 포타슘의 상실에 따라서 교환되는 쏘듐은 상실한 포타슘보다 적은량이 세포내로 들어간다고 보고하였다. 납 이온을 토끼 적혈구에 작용시킨 이상의 실험에서는 납 이온의 세포집단에 대한 반응으로 세포내의 포타슘의 상실은 측정하였으나 세포집단의 반응 태도에 대하여는 규명된 것이 없다.

용혈성 물질이 적혈구에 작용할 때에 용혈이 실제로 일어나기 전에 세포막의 투과성이 변동하여 세포집단의 하나하나의 세포에서는 각각 상이한 태도로 세포내의 포타슘을 유출시키는 사실은 이미 Ponder and Cox^{8,9)} 등이 주장하였다. 근래에 이르러 Passow and Tillman²⁾는 납 이온으로 중독된 사람 적혈구에서 삼투적 깨질성(cosmotic fragility)을 이용하여 세포 집단에 있어서 수분의 삼투 이동에 대한 각 세포막의 저항이 서로 상이한 고로 각각의 세포가 용혈을 일으키는 염류 용액 농도의 문턱값이 있다고 하였다. 그런고로 일부의 세포가 세포내의 포타슘을 모두 방출하는 어떤 농도에 있어서도 나머지 세포는 그대로 포타슘을 가지고 있다고 보고하였다. Eckel^{10,11)}은 NaF로 처리한 사람의 적혈구에는 포타슘을 잘 통과 시키는 세포군과 포타슘을 느리게 통과시키는 세포군이 있는고로 잘 통과시키는 세포군은 세포내의 포타슘을 완전히 투과이동 시킨다고 주장하였다. Passow, Rothstein and Loewenstein¹²⁾은 이이스트 세포에 Methylene blue를 작용시킨 실험에서 포타슘의 상실이 실무율(all-or-none law)에 따라 일어나며 높은 농도에서는 문턱 값에 달하는 세포가 많아져서 포타슘의 방출이 증가된다고 하였고, Weed, Eber and

Rothstein¹³⁾은 사람 적혈구에 Primaquine을 작용시킬 때 낮은 농도에서는 모든 세포가 균등하게 포타슘을 상실하나 높은 농도에서는 세포 집단 내의 각각의 세포가 실무율에 따라서 포타슘의 유출을 일으키는 것을 관찰하였다.

본실험은 토끼 적혈구에 납 이온을 작용시켜서 포타슘의 유출에 대한 분량과 반응관계를 분석하고 시간경과에 따르는 삼투적 깨질성의 변화와 세포막의 재생 등 납 중독으로 인한 세포막의 투과성 변화를 실험한 것이다. 아울러 아연, 동, 수은 이온 등의 토끼 적혈구막에 대한 포타슘의 투과성에 관해서도 관찰하였다.

실험 방법

토끼 적혈구에 납 이온(Pb^{++})을 작용시켜서 일어나는 포타슘 이온(K^+)의 세포막 밖으로의 이동을 보았는 바, 실험의 줄거리는 다음과 같았다. 정상 토끼에서 얻은 적혈구에 여러 가지 농도로 $PbCl_2$ 를 첨가한 후 적당한 시간 간격마다 일정량의 적혈구 부유액을 끄집어내고 원침하여 이미 유출된 포타슘을 제거한 다음 혈구막을 파괴하여 부유액 속의 포타슘 농도를 측정하였다. 즉 어떤 시간에 적혈구 속에 남아 있는 포타슘 분량을 측정하고 이것을 같은 분량의 부유액 내의 총 포타슘 분량과 비교하여 그 시간에 몇 % 가 남아 있는가를 그라프로 표시하였다. 혈액의 항응고제로는 구연산소다를 사용하였다.

심장 천자로 채집된 혈액을 10분간 원심분리하여 상동액 내의 혈장, 혈소판, 백혈구 등을 제거하였다. 분리된 적혈구를 생리식염수로 세번 세척하여 본 실험에 사용하였다. 혈구 1그램을 달아서 여기에 생리식염수와 여러 농도의 $PbCl_2$ 를 혼합한 용액 9ml을 넣어서 회석한 다음 이것을 실내 온도에 방치한 후 적당한 시간에 이 부유액 5ml 씩을 채집하여 이것을 다시 6분간 원심분리했다. 다음 상동액을 제거하고 밑에 남아있는 혈구를 homogenizer를 사용하여 기계적으로 갈아서 혈구를 파괴시킨 후 증류수로 50ml까지 회석했다. 이 용액의 포타슘 농도를 측정하여서 그 시간에 적혈구에 남아있던 포타슘의 값으로 하였다. 한편 적혈구 부유액 5ml을 취하여 기계적으로 혈구를 갈아 50ml 까지 증류수로 회석하고, 이 속에 있는 총 포타슘 량을 측정한 것을 기준 농도로하여 시간 경과에 따르는 세포내의 포타슘 량을 배분율로 표시하였다. 포타슘의 정량에는 Coleman flame photometer를 사용하였다.

납 이온을 적혈구에 중독시킨 다음 혈구막의 삼투적 깨질성의 변화를 시간경과에 따라 측정한 실험에서는 0.03 mM의 $PbCl_2$ 를 생리식염수에 혼합한 용액을 혈구와 1:10의 비율로 회석한 부유액 0.2ml을 취하여 여

러 농도의 식염수 20ml에 각각 15분간 실내 온도에 폭로한 다음 이것을 원심분리하여 상동액내의 혈색소 농도를 측정하였다. 혈색소 농도 측정은 Crosby 등의¹⁴⁾ 방법에 따랐다.

납 이온으로 중독된 세포막이 작용하는 시간에 따라 재생이 일어나는지를 관찰한 실험에서는 다음과 같이 조작하였다. 0.2ml의 $PbCl_2$ 를 90 mM KCl과 76 mM NaCl를 함유한 용액에 혼합시켜서 이 용액과 혈구를 1:1의 비율로 작용시켰다. 이때는 세포내와 같은 농도로 포타슘이 부유액내에 있으므로 포타슘은 세포막 밖으로 나오지 못하고 납 이온만이 세포막에 작용하게 된다. 이 부유액의 일부를 시간 간격을 두고 채집하여 1:10의 비율로 생리식염수에 회석하여 포타슘의 유출이 일어나도록 하고 시간의 경과에 따라 이 회석된 부유액을 5ml를 취하여 원심분리하여 상동액을 제거하고 다시 각 세포사이에 남아있는 포타슘을 제거할 목적으로 두번 생리식염수로 세척하고 남아있는 혈구를 기계적으로 갈아서 파괴시킨 다음 50ml 까지 증류수를 채워서 회석하고 이 회석된 용액내의 포타슘 량을 측정하여 포타슘의 유출 여부를 보았다.

적혈구막에 납 이온을 작용시킨 다음 포타슘의 유출과 동시에 세포내의 무기 인산염의 변동을 측정한 실험에서는 0.06 mM의 $PbCl_2$ 를 생리식염수에 혼합한 용액을 혈구 1그램에 대하여 9ml의 비율로 혼합한 후 시간 간격을 두고 5ml씩을 채집하여 원심분리한 다음 상동액을 제거하고 남아있는 혈구를 기계적으로 파괴해서 증류수로 50ml 까지 회석하여 이 회석된 혈구내의 포타슘 분량과 무기 인산염 분량을 Fiske and Subbarow¹⁵⁾의 방법에 따라서 측정하였다.

부유액 내의 pH는 인산소다 완충액으로 조절하였으며 Beckman pH meter(Model G)를 사용하여 결정하였다.

실험 성적

생리식염수 속에 여러가지 농도로 $PbCl_2$ 가 첨가된 용액을 토끼 적혈구에 작용시킬 때 세포의 포타슘 상실이 시간 경과에 따라 변화하였던 바 그 성적을 제 1 도에 표시한다. 생리식염수에 폭로한 적혈구에서는 포타슘의 상실이 일어나지 않았으나 $PbCl_2$ 의 농도가 증가함에 따라서 포타슘의 상실이 증가하였다. 일정한 $PbCl_2$ 의 농도에서는 작용후 60분까지는 포타슘의 유출이 빨리 일어나고 그 이후에는 서서히 일어나며 120분 후에는 극히 미량의 포타슘이 나온다. 그러므로 이 시기 이후에는 곡선은 시간축에 거의 평행하는 직선이 된다. 납으로 중독된 적혈구가 포타슘을 상실하는 시간 과정에서 상실 속도가 큰 시기와 작은 시기가 있으며 상실 속도가

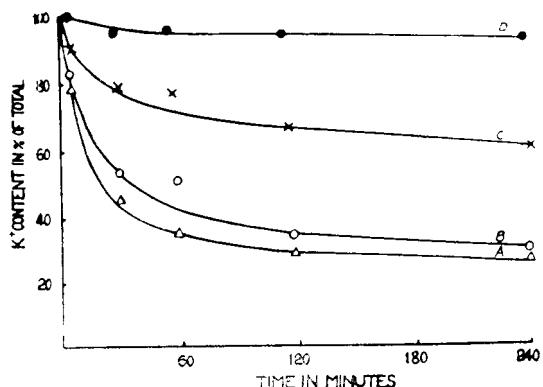


Fig. 1. Time course of loss of K^+ from rabbit erythrocytes by varying concentration of lead chloride. Ordinates: cell K^+ content as a percent of their initial value. Abscissae: time in minutes. The concentration of lead chloride in the suspension medium, in mM/L, A: 0.200, B: 0.030, C: 0.006, D: 0.000. Temperature 20°C.

큰 시기는 Pb의 농도에 관계없이 일정하게 나타난다. 포타슘의 상실 속도가 큰 시기에서는 남의 농도가 증가함에 따라 포타슘의 상실이 증가하였다.

남의 농도

남의 농도와 포타슘의 상실과의 관계를 보기 위하여 0.5×10^{-3} mM에서 20×10^{-3} mM의 PbCl₂를 적혈구에 120분 동안 작용시킨 다음 세포내에 남아있는 포타슘의 농도를 측정하였다. PbCl₂의 농도를 대수로 표시하고 포타슘의 상실을 백분율로 나타낸 누적 도수곡선은 대칭적인 S자형의 곡선을 나타내었다(제 2 도). 이것을 대수화률곡선으로 표시하면 직선이 되었다(제 3 도). 제 3 도에 표시한 대수화률곡선으로 미루어 보아 세포집단

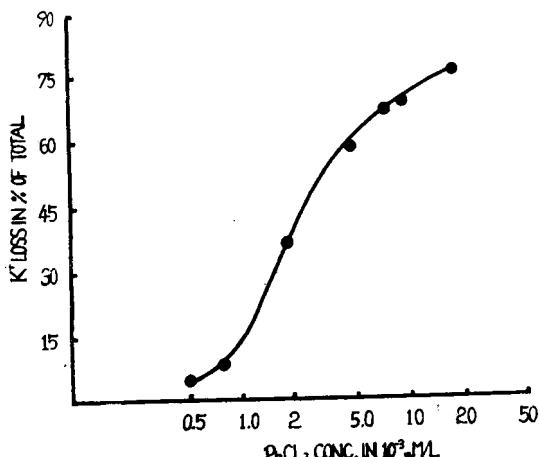


Fig. 2. The relation of lead chloride concentration and maximal K^+ loss. 2 hour value was taken as the maximal loss.

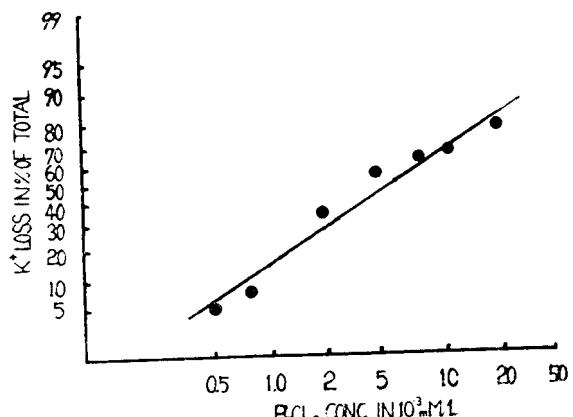


Fig. 3. K^+ loss versus lead chloride concentration on a log-probability plot. The data are taken from Fig. 2.

에는 서로 다른 문턱값을 가진 세포들이 있다고 하겠다. 즉 문턱값에 달하면 가지고 있던 포타슘을 완전히 방출하고, 문턱값에 달하지 못한 세포는 포타슘을 거의 또는 완전히 상실하지 않는 것으로 해석할 수 있다. 남이온의 농도가 높으면 문턱값에 도달하는 세포의 수효가 증가하여 세포집단 전체로서의 포타슘의 상실이 증가하며 농도가 낮은 데서는 문턱값에 도달하는 세포가 적어서 포타슘의 상실이 적은 것으로 해석된다. PbCl₂의 농도를 20×10^{-3} mM 이상으로 증가시키면 용혈이 일어났다.

삼투적 깨질성

남으로 종독된 토끼 적혈구막의 삼투적 깨질성의 변화를 보기 위하여 적혈구에 남을 작용시킨 다음 그 일부를 채집하여 여러 농도의 식염수에 폭로시켜서 혈구막의 삼투적 저항을 보았다. 제 4 도는 0.03 mM의 PbCl₂

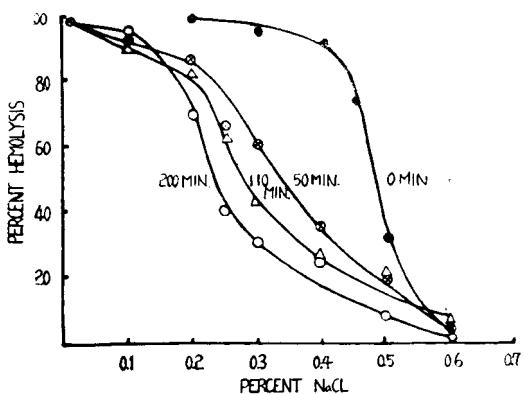


Fig. 4. Osmotic fragility studies on Pb-treated rabbit erythrocytes at varying times. The osmotic fragility was carried out on four samples incubated with 0.03 mM PbCl₂, for the time intervals indicated.

를 적혈구에 작용시킨 다음 50, 110, 200분 후에 각기 일정량의 부유액을 취하여 혈구막의 삼투적 깨질성을 본 것이다. 납이 작용한 직후에 이루어진 곡선은 정상 삼투적 깨질성 곡선과 일치하며, 납이 작용하는 시간이 경과하는데 따라서 곡선은 저장액 쪽으로 이동하여 세포막의 저항이 증가되는 것을 보여주었다.

일정한 시간 납이 작용한 삼투적 깨질성 곡선에서는 기선에 접근하여 저장액 쪽으로 이동하면서 점차적으로 약간의 상승을 나타내다가 급격히 상승하는 것을 볼 수 있었다. 이같은 세포막의 깨질성 곡선의 변동은 세포집단 내에 세포막의 저항이 서로 상이한고로, 저항이 높은 세포들은 저장액 내에서도 용혈이 일어나지 않고 저항이 낮은 세포들은 식염 농도가 비교적 높은 곳에서도 용혈을 일으키는 것으로 생각된다. 납의 중독으로 세포막의 저항이 높은것과 낮은것으로 나누어지는 사실은 일부의 세포는 가지고있던 포타슘을 모두 방출하고 나머지 세포들은 포타슘을 방출하지 않고 있음을 뒷받침하는 것이다. 포타슘을 상실한 세포는 위축되어 세포막의 저항이 증가되고 포타슘의 상실과 교환될 것인 쏘두의 세포내로의 이동이 곧 일어나지 않는 것으로 생각된다.

납의 세포막과의 결합

납은 토끼 적혈구막과 결합해서 세포내의 포타슘을 유출시키는 사실을 앞서 보았다. 납과 결합하는 유효기(有効基)를 찾기 위하여 실험하였다. 생리식염수에 0.03 mM의 $PbCl_2$ 를 함유한 용액에 20 mg%의 cysteine과 cystine을 각각 혼합하여 적혈구에 작용시켜서 시간 경과에 따르는 포타슘의 상실을 보았던 바 제 5 도에 표시하는 성적을 얻었다.

$PbCl_2$ 에 cysteine을 혼합한 용액으로 작용시킨 혈구

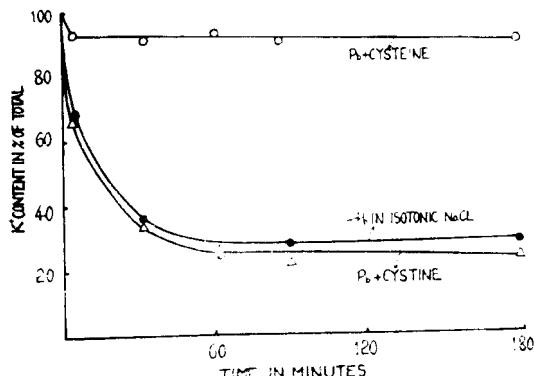


Fig. 5. Effects of cysteine and cystine on the K^+ loss from Pb-treated rabbit erythrocytes. At zero time of this graph, 20 mg% cysteine and cystine were added to the lead-treated cells.

에서는 포타슘의 상실이 거의 일어나지 않았으나, cystine과 혼합하여 작용시킨 혈구에서는 $PbCl_2$ 만을 생리식염수에 혼합한 용액으로 작용시킨 혈구와 별로 다른 차이가 없이 포타슘의 상실이 일어났다. 납과 cysteine을 혼합한 용액으로 작용한 혈구에서 포타슘의 상실이 일어나지 않는것은 납이 cysteine의 SH기와 결합하여 세포막의 유효기와 작용하는 것을 방해하는데 기인되는 것으로 생각된다.

한편 납과 cystine을 혼합한 용액에서 포타슘의 상실이 일어나는 것은 납이 SS기와는 결합하지 않는 것을 가리킨다고 하겠다. 납은 토끼 적혈구막의 SH기와 결합하여 세포내의 포타슘을 유출시키는 것으로 생각할 수 있다.

적혈구에 $PbCl_2$ 를 작용시킨 다음 10분 후에 이 부유액의 일부를 취하여 20 mg%의 cysteine을 부유액내에 첨가하여서 납으로 중독된 세포막에 대한 cysteine의 작

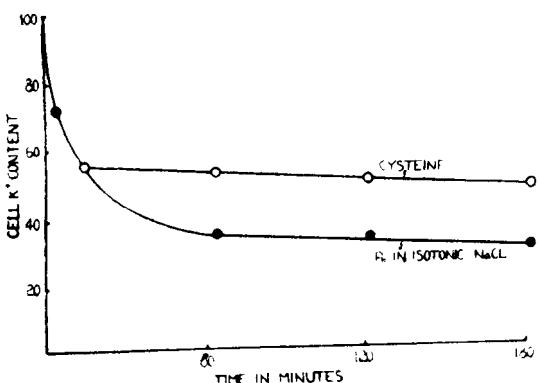


Fig. 6. Removal of Pb from rabbit erythrocytes by cysteine. After 10 minutes 20 mg% of cysteine was added to the Pb-treated cells.

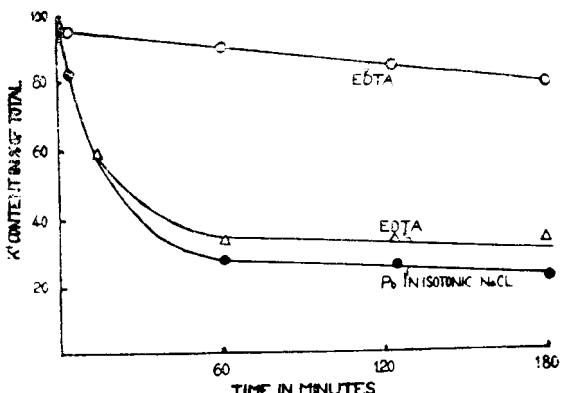


Fig. 7. Removal of Pb from the rabbit erythrocytes by ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) at different times. At zero time and after 10 minutes, 8 mM EDTA were added to the Pb-poisoned cells, respectively.

용을 보았던 바, 제 6 도의 성적과 같았다. 납의 작용으로 나타났던 포타슘의 유출은 cysteine 의 첨가로 인하여 완전히 정지되었다.

0.06 mM 의 $PbCl_2$ 를 적혈구에 작용시킨 다음 10 분이 경과하고 나서 8mM 의 ethylenediaminetetra-acetic acid(EDTA)를 부유액내에 첨가한 실험에서는(제 7 도) 계속 포타슘의 상실이 일어났으나 상실량은 감소되었다. 즉 EDTA 는 cysteine 같이 세포막에 대한 납의 작용을 방지하지 못하였다.

세포막의 재생

트끼 적혈구에 납을 작용시킨 다음 작용하는 시간을 연장하여 세포막의 재생 여부를 관찰한 실험을 제 8 도

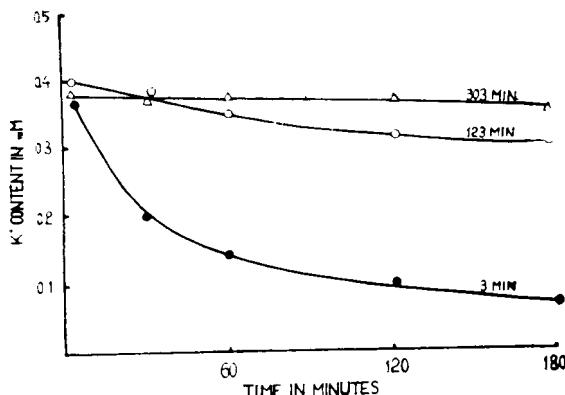


Fig. 8. The K^+ -loss from Pb poisoned rabbit red cells after incubation with lead at varying times. At a 1 : 1 ratio, 1 gm of cells was added to 1 ml of suspension medium, which contained 90 mM KCl, 76 mM NaCl and 0.2 mM $PbCl_2$. In the different times, a part of this suspension were diluted with 166 mM NaCl, at a 1 : 10 ratio. Thereafter, the time courses of K^+ -loss from the cells in this suspension were measured. Ordinates: cell potassium content in 5 ml of suspension. Abscissae: Time in minutes.

에 표시한다. 적혈구에 납을 함유한 등장성 $KCl + NaCl$ 의 혼합용액을 작용시켜 세포내의 포타슘과 부유액의 포타슘 농도를 같은 크기로 유지하여 포타슘의 유출을 방지한 다음 3, 123, 303분에 부유액의 일부를 취하여 생리식염수로 희석하여 포타슘 유출이 일어나도록 하고 세포내의 포타슘을 측정하였다. 납을 함유한 등장성 $KCl \times NaCl$ 용액에 3 분 동안 푸로된 세포에서는 60 분 까지 포타슘의 유출이 빠르게 일어나고 그 후에는 서서히 일어났다. 2시간 납의 작용을 받은 세포에서는 적은 양의 포타슘을 서서히 세포밖으로 방출 하였으며 포타슘의 상실속도가 큰 시기가 나타나지 않았다. 납의 작용이 5시간 경과한 세포에서는 포타슘의 유출이 일어나지

않았다. 이것은 세포막에 납이 작용하여 처음에는 세포막이 손상되어 포타슘을 방출하다가 2시간 후에는 세포막의 재생이 일어나서 포타슘의 유출이 감소되고 5시간 후에는 완전히 세포막의 재생이 일어나는데 기인되는 것으로 생각된다.

pH 의 영향

일정량의 $PbCl_2$ 를 생리식염수에 혼합한 용액내의 pH 를 변동시켜서 포타슘의 투과성에 미치는 pH 의 영향을 보았다. 생리식염수에 0.03 mM 의 $PbCl_2$ 를 혼합한 용액에 Na-phosphate 완충액으로 pH 를 5.5에서 8.3 까지 변동시켜서 혈구에 120분간 작용시킨 다음 포타슘의 상실을 보았던 바제 9 도의 성적을 얻었다. pH 가 5.5에

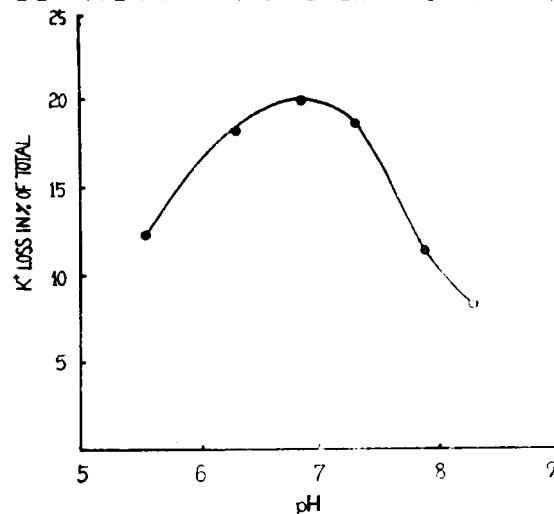


Fig. 9. The effect of pH on the permeability of the Pb-treated rabbit cells to potassium.

서 7 까지의 사이에서는 포타슘의 상실이 증가하고 7에서 8.3에 이르는 사이에서는 산성쪽 보다 급격히 포타슘의 투과성이 감소되었다. pH 가 7 부근에서 포타슘의 투과성이 최대에 달하는 것을 볼 수 있었다.

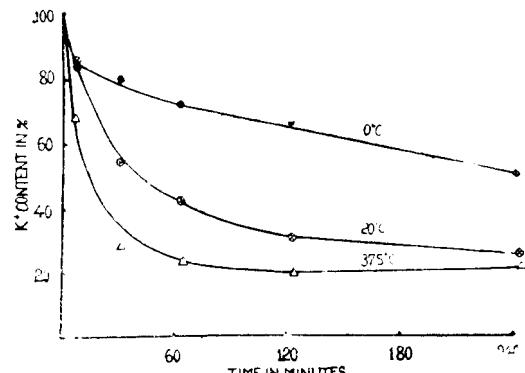


Fig. 10. The effect of temperature on the permeability of the Pb-poisoned rabbit red cells to potassium.

온도의 영향

온도의 변동이 납으로 중독된 세포에 미치는 영향을 보기 위하여 온도 0°C 내지 37.5°C 사이에서 0.03 mM 의 PbCl_2 를 작용시켜서 포타슘의 상실을 측정하여 제 10 도의 성적을 얻었다. 온도의 변동에 따라 납으로 중독된 세포의 포타슘의 투과성이 달라지며 온도가 높아짐에 따라서 포타슘의 상실이 증가되었다. 즉 납으로 중독하여 120 분 경과한 다음 0°C 에서는 30% 의 상실이 일어나고 37.5°C 에서 80% 의 상실이 일어났다. 0°C 에서는 시간의 경과에 따라 점차적으로 이온의 상실이 일어났으나 20°C 와 37°C 에서는 60 분까지 빨리 상실하고 그 후에는 거의 유출이 일어나지 않았다.

세포내 무기 인산의 형성

0.06 mM 의 PbCl_2 를 적혈구에 작용시킨 다음 시간경과에 따라서 세포내의 무기인산과 포타슘을 동시에 측정하여 제 11 도에 표시하는 성적을 얻었다.

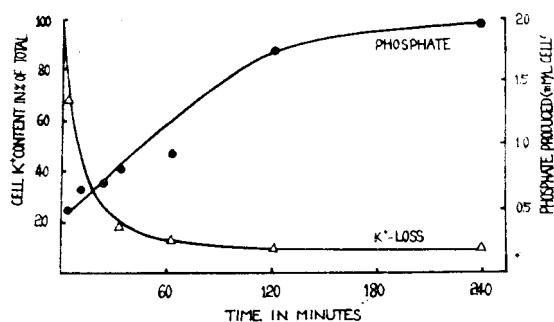


Fig. 11. Relationship between percent loss of K^{+} and formation of intracellular inorganic phosphate induced by Pb -poisoned rabbit cells.

납으로 중독된 세포내의 무기 인산은 포타슘의 상실 속도가 큰 시기에서 급격히 증가하고 속도가 작은 시기에서는 거의 증가되지 않았다. 납으로 인한 세포내의 포타슘의 상실속도에 따라서 무기 인산의 산출은 변동하는 것을 알 수 있었다.

기타 중금속들의 작용

Zn , Cu , Hg 등 토끼 적혈구에 대한 작용을 보기 위하여 0.03 mM 의 ZnCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 및 PbCl_2 를 생리식염수에 혼합하여 혈구에 작용시켜 세포내의 포타슘을 측정하였다(제 12 도).

수은과 납 이온은 별 다른 차이가 없이 포타슘의 유출을 일으키지만 아연은 아무 영향을 주지 않았으며 동은 약간의 상실을 일으켰다.

수은과 납은 세포막의 같은 작용기에 작용하여 같은 기전으로 포타슘의 유출을 일으키는 것으로 생각되었다.

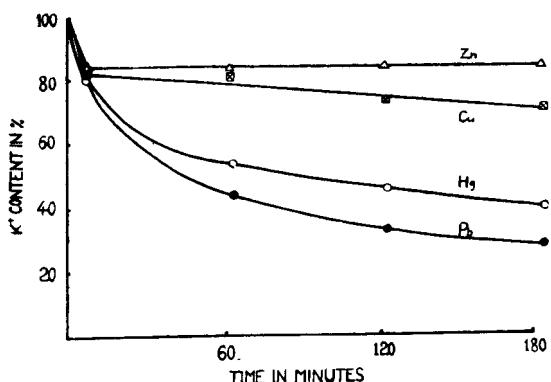


Fig. 12. The action of various heavy metals on the potassium permeability of the rabbit red cells. All heavy metal concentrations 0.03 mM/L .

고찰

토끼 적혈구에 납을 작용하여 일어나는 포타슘의 투과성의 변동은 상실속도가 큰 시기와 작은 시기를 나타내고 납의 농도가 증가하는데 따라 세포내의 포타슘의 상실이 증가하였으나 상실속도는 증가하지 않았다. 이와 같은 반응은 세포집단내에 서로 다른 반응을 나타내는 세포들이 있어서 납의 작용이 문턱값에 도달한 세포는 60 분 내에 세포내의 포타슘을 모두 부유액쪽으로 내보내고 나머지 세포들은 그대로 가지고 있는 것 같다. 농도의 증가에 따라서 포타슘의 상실이 증가되는 것은 세포 집단내에 문턱값에 도달하여 이온을 유출시키는 세포의 수효가 증가하는데 기인된다.

농도와 반응 관계에서 얻은 대수화를 곡선과 누적도수곡선으로 미루어 보아 농도와 포타슘 상실과의 관계는 정상분포에 합치하며 세포집단 내에 있는 세포들은 문턱값이 서로 상이한 저항을 가지는 것이어서 문턱값에 도달한 세포는 포타슘을 모두 방출하고 도달못한 것은 방출하지 않는 것을 알 수 있다.

납으로 중독된 적혈구의 삼투적 깨질성을 관찰한 실험에서는 세포막의 삼투적 저항도 세포에 따라서 상이함이 증명되었다. 삼투적 저항이 높은 세포는 세포내의 포타슘을 모두 방출하여 위축되어 그 이후로는 막의 저항이 높아져서 저장액 속에서도 용혈이 일어나지 않았으나, 포타슘을 상실하지 않은 세포는 삼투적 저항이 비교적 낮은데서도 용혈을 일으키는 것으로 생각된다. 세포막의 삼투적 저항이 납의 작용으로 차이를 나타내는 것은 각각의 세포가 실무률에 따라 포타슘을 방출하는 태도를 가진다고 하겠다.

이와 같이 토끼 적혈구에 납을 작용하여 일어나는 반응은 사람 적혈구에 납을 중독시킨 Passow and Till-

mar²⁾의 실험과 Eckel^{10, 11)}이 NaF를 작용시킨 실험에서 세포집단내의 각각의 세포는 실무울에 따라 포타슘을 방출한다는 관찰과 일치하는 것이다. 또한 Passow, Rothstein and Loewenstein¹²⁾ 등이 methylene blue을 아이스트 세포에 작용시켜서 포타슘의 상실이 실무울에 따라서 일어났던 것과도 일치한다.

삼투적 깨질성에서 납으로 처리한 토끼 적혈구막은 삼투현상에 대하여 저항이 증가되는데 이것은 Passow and Tillman²¹⁾이 납으로 중독한 사람 적혈구에서 세포막의 삼투적 저항이 증가되는 것을 관찰한 것과 같은 결과이나 Weed, Eber and Rothstein¹³⁾ 등이 Primaquine을 사람 적혈구에 작용시켜 삼투적 깨질성의 변화를 본 실험에서 혈구막의 저항이 감소되었다는 결과는 서로 상반되는 현상이다. Vincent and Blackburn^{16, 17)}은 납을 사람 적혈구에 작용한 실험에서 세포내의 포타슘이 세포막 밖으로 나가지만, 이에 수반되어 쏘듐이 세포내로 이동하지 않고 쏘듐의 이동은 시간적으로 늦게 일어나는 것을 관찰하였고 Joyce, Moore and Weatherall¹¹⁾은 납 중독으로 토끼 적혈구에서 포타슘을 상실한 세포는 상실한 이온 보다 적은량의 쏘듐을 세포내로 받아들이는 것이라고 주장한 바 있다. 이상의 실험결과들로 보아 납으로 중독된 세포막의 저항이 증가되는 것은 포타슘을 상실한 세포가 쏘듐을 세포내로 들어오게 하는 것이 포타슘의 상실에 잘 수반되지 않아서 세포가 위축하는데 기인하는 것을 암시하고 있다. 한편 Primaquine으로 처리된 사람 적혈구에서는 이온의 투과성이 증가되어 포타슘의 상실에 수반하여 쏘듐이 세포내로 이동하여서 세포막의 저항이 감소되는 것으로 생각된다.

Grigarzik and Passow⁶⁾는 사람 적혈구에서 납은 세포막에 있는 SS 기와 결합하여 포타슘의 유출이 일어난다고 하였고 Passow, Rothstein and Loewenstein¹²⁾은 methylene blue를 아이스트 세포에 작용하면 세포막의 SH 기를 유효기(有効基)로 하여 이와 결합한다고 하였다. 수은은 사람 적혈구막에서 세포막의 SH 기와 결합하여 포도당의 세포내으로의 이동을 억제하고⁵⁾ Primaquine은 혈구막의 SH 기를 유효기로 하고 있다고 보고된 바 있다¹⁸⁾.

한편 Passow, Rothstein and Clarkson¹⁹⁾은 납이 세포막과 작용하여 나타내는 화학적 성질이 SH 기와 친화력이 강한 수은과 결합한 세포막의 성질과 다른것으로 보아 납은 세포막의 SH 기와 결합하지 않는것 같다고 말하였다. 본 실험에서 cysteine과 납을 같이 혼합하여 작용한 적혈구에서 포타슘의 유출이 전혀 일어나지 않고 cysteine과 혼합하여 작용한 세포에서는 납만을 작용했을 때와 별로 차이없이 포타슘의 상실이 일어나는 것으로 보아 납은 혼합한 cysteine의 SH 기와 결합하여

세포막과는 작용하지 못하는 것으로 생각된다. 납은 토끼 적혈구막에 작용하여 세포막의 SH 기와 결합하여 포타슘의 유출을 일으키지만 SS기는 납의 혈구막에 대한 작용에는 아무 관련이 없는 것을 알 수 있다.

납으로 적혈구를 중독한 후에 cysteine을 첨가하면 지금까지 있었던 이온의 유출이 완전히 정지되고 만다. 이것은 부유액내의 납이 cysteine의 SH 기와 결합하여 납을 그 이상 세포막에 작용시키지 않을 뿐만 아니라 세포막에 작용된 납에도 영향하여 포타슘의 유출을 전지하는 것을 암시한다. 한편 EDTA를 납과 같이 중독한 데서는 포타슘의 유출이 일어나지 않는 것은 부유액내의 납이 EDTA와 결합하여 납의 세포막에 대한 작용을 방해하는 결과이나 납을 작용한 후 EDTA를 첨가한 데서는 계속 포타슘의 유출이 일어나고 유출되는 량은 감소된다. 이것은 EDTA는 부유액내의 납과 결합하고 세포막에 결합된 납을 제거하지 못하여 계속 이온의 유출을 일으키는 것으로 생각된다.

Passow and Tillman²⁾은 사람 적혈구에 납을 작용시켜 2시간 후에 세포막의 재생이 일어나기 시작하여 5시간 후에는 재생이 거의 완성하여 극히 적은 량의 포타슘이 유출함을 관찰하였다. 토끼 혈구에 납을 작용시키면 시간이 경과하는데 따라서 세포막의 재생이 일어난다.

납으로 중독한 토끼 혈구는 2시간 후에 재생이 일어나서 적은량의 포타슘을 유출시키나 5시간 후에는 거의 완전한 막의 재생으로 유출이 정지되었다. 이같은 세포막의 변화는 납이 세포막의 SH 군과 반응하여 일어나는 것으로 처음에는 세포막의 SH 기와 $\text{S}-\text{Pb}$ 복합체를 구성하여 이온의 유출을 일으기던 막의 시간이 경과하는데 따라 점차 S-Pb-S 형으로 되어 막의 재생이 일어나서 이온을 유출시키지 않는 것 같다.

적혈구막에서 농도 경사에 역행하여 포타슘을 안으로 넣고 쏘듐을 밖으로 내보내서 세포는 이온의 조성을 유지하게 되며 이 에너지가 세포내 해당작용 과정의 ATP의 분해에서 오는 것이라고 여러 연구자들이 보고하고 있다^{20, 21, 22, 23)}. 중금속은 이같은 세포막의 능동적인 이온의 투과작용과 세포내의 신진대사에 영향을 주어 이온의 상실이 일어나는 것이라고 주장된 바 있고¹⁶⁾ Harris는 NaF으로 처리된 적혈구에서나 납으로 중독된 혈구에서 포타슘이 세포밖으로 투과되어 나오는 것이 다같이 세포내의 해당작용에 영향하여 일어나는 것이라고 주장했다²⁴⁾. Lindman and Passow²⁵⁾는 사람 적혈구에서 납 중독이 있을 때에 세포내의 ATP가 격감되는 것을 보고하였다. 본 실험에 납으로 중독한 토끼 혈구내의 무기 인산의 산출을 측정하였던 바 포타슘의 상실속도가 빠른 시기에서 급격한 증가가 일어나고 상실속도가 느

린 시기에서는 증가되지 않는 것을 보았다. 이것은 세포내의 포타슘의 상실속도가 큰 시기에서는 해당작용에 인한 ATP의 분해가 촉진되는데 비하여 느린 시기에서는 분해가 거의 이루어지지 않는데 기인하는 것으로 생각된다. 납은 토끼 적혈구에 작용하여 포타슘을 상실한 세포내의 해당작용을 촉진하나 상실하지 않는 세포내의 해당작용에는 영향을 미치지 못한다.

적혈구막에서 양이온의 투과성에 미치는 pH의 영향에 관해서 Flynn²⁶⁾과 Ponder²⁷⁾ 등은 사람의 정상 적혈구에서 pH가 7.2부터 7.6 사이에서 포타슘의 투과가 증가되는 것을 보고하였고 Davson and Reiner²⁸⁾는 고양이 적혈구에서 쏘듐이 pH가 7.1부터 7.5 사이에서 잘 투과되고 포타슘도 같은 영향을 받으나 투과되는 양이 적다고 하였으며 쏘듐은 온도 35°C 내지 40°C 사이에서 잘 투과되나 포타슘은 이같은 온도의 영향을 받지 않는다고 하였다. 한편 납으로 중독된 사람 적혈구에서 pH를 7.0에서 7.6으로 변동시켜 포타슘의 투과성을 측정한 실험에서는 최적 pH는 7.0이라 보고되어 있으며²⁾ primaquine을 사람 적혈구에 중독시키는 실험에서 pH가 7.4 때보다 7.8에서 K⁺의 투과성이 증가되었다는 보고도 있다¹³⁾. 토끼 적혈구에 납을 작용시킨 본 실험에서는 부유액내의 pH가 6.8 내지 7.1 사이에서 포타슘의 투과성이 증가되고 최적 pH는 7.0을 나타내며 온도는 20°~37°C에서 투과성이 증가되었다. 토끼 적혈구에 납 중독을 일으킬 때의 최적 pH는 사람 적혈구에 작용할 때와 같은 값을 나타내며 정상 적혈구에서 포타슘의 투과성을 증가시키는 최적 pH보다는 산성쪽으로 기울어져 있었다.

Zn, Cu, Hg, Pb 등은 다 SH기와 결합할 수 있으나 Hg와 Pb는 토끼 적혈구막에 작용하여 포타슘의 유출을 일으키고 Zn는 일어나지 않으며 Cu는 극히 적은 양의 유출을 일으킨다. 아이스트 세포막에서는 Hg와 Cu는 이온의 유출을 일으키나 Pb와는 아무 반응이 일어나지 않는다. Hg는 아이스트 세포막에서 SH기와 결합하여 invertase의 작용을 억제하게 되는데 Hg는 SH기와 잘 결합 할 수 있으나 다른 유효기와 결합하여 억제 작용을 하게된다²⁹⁾.

중금속이 세포막과의 작용에는 SH기가 중요한 역할을 하고 있으나 이와같은 화학적 특이성으로 보아 SH군과의 결합에는 또 다른 요인이 관계되어 있다는 것을 암시하고 있는 것이다.

결 론

토끼 적혈구에 납 이온을 작용시켜 포타슘의 투과성에 미치는 영향을 관찰하였다. 시간경과에 따른 포타슘의 상실과 삼투적 깨질성을 측정하고 양과 반응 관계

를 분석하였으며 세포막의 대생 여부 등을 실험하였다. 아울러 Cu, Zn, Hg 등의 세포막에 대한 작용도 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 토끼 적혈구에 일정농도의 PbCl₂를 작용시키면 포타슘의 유출이 일어나며 작용후 60분 까지는 빠르게 나오고 그 후에는 극히 적은 양이 서서히 나왔다. PbCl₂의 농도가 0.5×10⁻³ mM에서 20×10⁻³ mM 까지는 용혈을 일으키지 않았고 포타슘의 유출만이 일어나고 20×10⁻³ mM 이상에서는 용혈이 일어났다.

2) 납 이온 작용으로 일어나는 토끼 적혈구의 포타슘 상실은 세포집단 내에 있는 각 세포로부터 실무율에 따르는 태도로 포타슘을 방출케 하였다.

3) 토끼 적혈구막에서 납은 SH기와 결합하여 포타슘의 상실을 일으킴을 보았다.

4) 납으로 중독된 토끼 적혈구막은 시간경과에 따라 재생하였으며 5시간이 지난 후에는 완전히 재생되었다.

5) 납으로 중독된 토끼 혈구는 부유액내의 pH와 온도의 영향을 받으며 온도 20°C 내지 37°C에서 포타슘의 투과성이 증가되고 최적 pH는 7.0이었다.

6) 토끼 적혈구내의 무기 인산은 납 이온의 작용으로 인한 포타슘의 상실속도가 큰 시기에서 급격히 증가되고 느린 시기에서는 증가되지 않았다.

7) 수은과 납은 토끼 혈구막에 작용하여 포타슘의 유출을 일으키나 아연 이온은 작용이 없었고 동 이온으로는 극히 적은 양의 유출이 일어났다.

(이 실험을 지도하시고 편달하여 주신 남기용 교수와 고일섭 조교수께 사의를 표한다.)

ABSTRACT

The Effects of Lead on the Potassium Transport of Rabbit Blood Cells.

Kohn Sik Min, M.D.

Department of Physiology, College of Medicine,
Seoul National University, Seoul, Korea
(Director: Prof. Kee Yong Nam, M.D.)

The effects of lead on the permeability of rabbit red cells to potassium were studied by analyzing dose-response, time-response curves and osmotic fragility changes at varying times. Other metal cations, such as mercury, copper and zinc were also tested. The following results were obtained.

1) Lead chloride caused loss of K⁺ from rabbit red cells at concentrations ranging between 0.5×10⁻³ and 20×10⁻³ mM.

The K⁺loss progressed rapidly for about 60 minutes, but thereafter slowed down.

Lead chloride induced a prehemolytic loss of K⁺ from the red cells over a range from 0.5×10^{-3} mM to 20×10^{-3} mM/L PbCl₂, and at concentration above 20×10^{-3} mM, hemolysis began to appear.

- 2) The lead induced a loss of K⁺ from rabbit red cells as an all-or-none response of individual cells within the population.
- 3) As the time elapsed after lead poisoning on red cells, a recovery of cell membrane was observed. It took five hours for the cell membrane to recover.
- 4) Factors which influence the loss of K⁺ from the Pb poisoned rabbit red cells were pH and temperature. The maximum permeability to K⁺ occurred between 20° and 37°C and there was an optimum pH for penetration of K⁺ in the region of 7.0.
- 5) The formation of intracellular inorganic phosphate in the lead poisoned rabbit red cell was augmented greatly in the rapid K⁺ loss phase, and thereafter slowed down slightly.
- 6) Mercury and lead induced K⁺ leakage in rabbit red cells, but zinc didn't, while copper had a much smaller effect.
- 7) The relation between sulfhydryl group and Pb binding on red cell membrane was discussed.

REFERENCES

- 1) Joyce, C.R.B., Moore, H. and Weatherall, M.: *The effects of lead, mercury and gold on the potassium turnover of rabbit blood cells*. *Brit. J. Pharmacol.* 9:463, 1954.
- 2) Passow, H., and Tillman, K.: *Untersuchungen über den Kaliumverlust bleivergifteter Menschenerthrocytes*. *Pflügers Archiv. Bd.* 262:23, 1955.
- 3) Clark, M.: *General Pharmacology*. In Heubner Schüller, *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, 4:228, Springer-Verlag, Berlin, 1937.
- 4) Passow, H., and Rothstein, A.: *The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability*. *J. gen. Physiol.* 43:621, 1960.
- 5) Weed, R., Eber, J., and Rothstein, A.: *Interaction of mercury with human erythrocytes*. *J. gen. Physiol.* 45:395, 1962.
- 6) Grigarzik, H., and Passow, H.: *Versuche zum Mechanismus der Bleiwirkung auf die Kaliumpermeabilität roter Blutkörperchen*. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 267:73, 1958.
- 7) Henriques, V., and Orskov, S.L.: *Änderung der Kaliumkonzentration in den Blutkörperchen bei Bleivergiftung*. *Scand. Arch. Physiol.* 74:78, 1936.
- 8) Ponder, E.: *Hemolysis and related phenomena*. Grune and Stratton, New York, 1948.
- 9) Ponder, E., and Cox, R.T.: *Hemolysis considered as a progressive reaction in a heterogenous system*. *J. gen. Physiol.* 35:595, 1952.
- 10) Eckel, R.E.: *Potassium exchange in human erythrocytes. I. General aspects of the fluoride effect*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 51:81, 1958.
- 11) Eckel, R.E.: *Potassium exchange in human erythrocytes, II. The division of cell potassium into two fractions during incubation with 0.025 M NaF*. *J. Cell comp. physiol.*, 51:109, 1958.
- 12) Passow, H., Rothstein, A., and Loewenstein, B.: *An all-or-none response in the release of potassium by yeast cells treated with Methylene Blue and other basic redox dyes*. *J. gen. Physiol.* 43:97, 1959.
- 13) Weed, R., Eber, J., and Rothstein, A.: *Effects of primaquine and other related compounds on the red blood cell membrane. I. Na⁺ and K⁺ permeability in normal human cells*. *J. Clin. Invest.* 40:130, 1961.
- 14) Crosby, W.H., Munn, J.F., and Furth, F.W.: *Standardizing a method for clinical hemoglobinometry*. *U.S. Armed Forces Med. J.* 5:693, 1954.
- 15) Fiske, C.H., and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous*. *J. Biol. Chem.* 66:375, 1925.
- 16) Vincent, P.C., and Blackburn, C.R.B.: *The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. I. Comparisons of the action of several heavy metals*. *Aust. J. exp. Biol. med sci.* 36:471, 1958.
- 17) Vincent, P.C.: *The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. II. The effects of lead and mercury*. *Aust. J. exp. Biol. med sci.* 36:589, 1958.
- 18) Bensch, R.E., and Basch, R.: *Relation between erythrocyte integrity and sulfhydryl group*. *Arch. Biochem.* 48:38, 1954.
- 19) Passow, H., Rothstein, A., and Clarkson, T.W.: *The general pharmacology of the heavy metals*. *Pharmacol. Rev.* 13:185, 1961.
- 20) Danowski, T.S.: *The transfer of potassium across the human blood cell membrane*. *J. Biol. Chem.* 139:

- 693, 1941.
- 21) Harris, J.E.: *The influence of the metabolism of human erythrocytes on their potassium content. J. Biol. Chem.* 141:579, 1941.
- 22) Maizelo, M.: *Cation control in human erythrocytes*. *J. physiol.* 108:247, 1949.
- 23) Glynn, I.M.: *Ionic permeability of the red cell membrane. Progr. Biophysics.* 8:242, 1957.
- 24) Harris, E.J.: *Transport through biological membranes. Ann. Rev. Physiol.* 19:13, 1957.
- 25) Lindman, B. and Passow, H.: *Kaliumverlust und ATP zerfall in bleivergifteten Menschenerythrocyten. Pflüg. Arch. ges Physiol.* 271:369, 1960.
- 26) Flynn, F., and Maizels, M.: *Cation control in human erythrocytes*. *J. Physiol.* 110:301, 1949.
- 27) Ponder, E.: *Accumulation of K by human red cells. J. gen. Physiol.* 33:745, 1950.
- 28) Davson, H., and Reiner, J.M.: *Ionic permeability: An enzyme-like factor concerning the migration of Na through the cat erythrocyte membrane. J. Cell comp. Physiol.* 20:325, 1942.
- 29) Myrbäck, K.: *Inhibition of yeast invertase (saccharase) by metal ions. V. Inhibition by mercury compounds. Ark. Kemi.* 11:471, 1957.