

Kanendomycin 이 토끼 적혈구막의 포타슘 투과에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

<지도 : 이 상 호 부교수>

김 정 한

= Abstract =

The Effects of Kanendomycin on the Potassium Permeability of the Rabbit Erythrocyte Membrane

Jung Han Kim, M.D.

Department of Physiology, College of Medicine, Busan National University

(Director : Assoc. Prof. Sang Ho Lee, M.D.)

The effects of kanendomycin on the potassium permeability in the rabbit erythrocyte membrane are investigated and the results are summarized as follows.

1. Kanendomycin causes the efflux of K^+ and influx of Na^+ across the rabbit erythrocyte membrane.
2. Osmotic resistance of kanendomycin treated erythrocytes is diminished. This diminution of osmotic resistance is more pronounced by increasing concentration of kanendomycin and longer incubation time. But osmotic resistance is rather increased in the presence of lower concentration of kanendomycin.
3. Cysteine and glutathione have little influence on K^+ efflux induced by kanendomycin.
4. EDTA has no effect on the increase in K^+ outflux by kanendomycin while PCMB augments slightly on K^+ outflux.
5. Kanendomycin inhibits Ca^{++} binding competitively to rabbit erythrocyte membrane fragments.

서 론

적혈구나 신경세포막 등 생체막에서 K^+ 과 Na^+ 은 펌프작용에 의하여 세포내 이온의 조성을 유지하고 있으며^{1,2)} 이러한 Na^+ 과 K^+ 의 능동적인 이동에 Na^+-K^+ activated adenosine triphosphatase (Na^+-K^+ ATPase) 효소계가 밀접한 관련을 가지고 있다는 것은 널리 알려진 사실이다³⁾. 1958년 Umezawa⁴⁾에 의하여 kanamycin (2'-amino-2'-deoxystreptomine)이 발견된 이래 이 항생제는 gram 양성균 및 음성균과 항산성균에 대한 광범위한 항균작용이 임상적으로 입증되어 우수한 치료 효과를 거두고 있음은 주지의 사실이다.

그러나 kanamycin은 streptomycin 및 neomycin 등

과 같이 청력장애를 초래하므로 이들 약물의 좋은 치료효과에도 불구하고 때로는 사용을 중지하지 않으면 안될 경우가 생기게 되었다^{5,6)}.

그 동안 이러한 이 중독성(耳中毒性) 약물의 내이(內耳) 병변 발생기전을 규명하기 위하여 많은 연구가 이루어졌는데 Stupp 등⁷⁾은 kanamycin의 투여로 내림파액의 농도는 혈중농도 보다 훨씬 높은 반면 그 배설은 타장기에 비하여 보다 늦으므로 내이조직이 선택적으로 손상을 받는다고 하였다. 또한 El-Mofty 및 El-Serafy⁸⁾와 Mizukoshi 및 Daly⁹⁾ 그리고 Ishiyama¹⁰⁾ 등은 kanamycin이 막아우 및 간 mitochondria의 호기성 대사를 억제시킨다고 하였다.

더욱이 Na^+ 과 K^+ 등 양 이온의 능동적인 이동에 밀접한 관련을 갖고 있는 ATPase¹¹⁾의 활성도가 kanamycin

cin에 의하여 억제된다고 하였으며^{12,13}, Henderson 등¹⁴과 Guerra 등¹⁵은 항생물질들이 세포막의 투과성에 미치는 영향을 관찰한 실험에서 항생물질중에는 적혈구막이나 mitochondria 막에서 알칼리성 금속 이온의 투과성을 증가시킴을 보고한 바 있다. 이와 같이 몇몇 항생제와 더불어 kanamycin도 생체막의 이온의 투과와 mitochondria의 호기성 대사에 밀접한 영향을 미치는 바, 최근 1968년 kanamycin에 비해서 독성이 적고, 항균작용이 강력한 kanamycin과 유사한 구조를 가진 kanendomycin (2'-amino-2'-deoxykanamycin)이 Umezawa에 의해서 개발되었다.

Kanamycin이 사람 적혈구막에 미치는 영향에 대한 연구 보고는 있으나¹⁶ kanendomycin이 토끼 생체막에 미치는 영향에 대해서는 아직 잘 알려지지 않았기에 저자는 kanendomycin이 토끼 적혈구막의 K⁺의 투과와 삼투성 용혈, 여기에 대한 SH⁻ 결합물질의 영향 그리고 적혈구막에 있어서 Ca⁺⁺ 결합에 미치는 영향등을 관찰코저 이 실험을 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

일정한 조건하에서 사육한 체중 2kg 내외의 건강한 백색 토끼를 자동 구별없이 사용하였다.

실험방법

1. 심장 천자로 얻은 혈액을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액내의 혈장, 혈소판, 백혈구 등을 제거한 다음, 분리된 적혈구를 생리식염수로 3번 세척하여 실험에 사용하였다. 각종 농도의 kanendomycin (Meiji LTD) 생리식염수 9ml와 혈구 1ml의 비율로 혼합하여 적혈구 부유액을 만든 다음, 이것을 37°C에 incubate 한후 30, 60, 120 및 180분 간격을 두고 이 부유액 5ml을 취하여 이것을 다시 10분간 원심분리하였다. 그리고 그 상등액을 제거하고 밑에 남아 있는 혈구를 homogenizer를 사용하여 기계적으로 파괴시킨후 증류수를 첨가하여 전량이 50ml 되도록 한 다음, 이 용액의 K⁺ 농도를 측정하여 그 시간에 적혈구에 남아 있는 K⁺의 값으로 간주하였다. 전기 적혈구 부유액의 시간 경과에 따르는 세포내의 K⁺함량의 변동은 kanendomycin이 포함되어 있지 아니한 생리식염수 적혈구 부유액의 K⁺함량을 기준으로 하여 백분율로 표시하였다.

K⁺의 정량에는 Coleman flame photometer를 사용

하였다. 그리고 적혈구 부유액에 관한 Na⁺ 농도의 측정도 K⁺의 경우와 마찬가지로 하였다. 부유액내의 pH는 Tris-Cl 혹은 Tris-M.A. (maleic-acid, Sigma Co.)로 7.0으로 조절하였으며 pH 측정은 Beckman pH meter로 하였다.

2. 적혈구내로의 Na⁺ 이동에 대한 kanendomycin의 영향을 관찰한 실험에서는 분리한 적혈구와 생리식염수의 비율 1:4로 혼합하여 적혈구 부유액에 pH 7.0으로 조절된 10mM Tris, 1mM CaCl₂ 및 50mM NaCl 용액을 동량첨가하여 대조군으로 하고 이와 동일한 적혈구 부유액조성을 가진 용액에 10mg/ml의 kanendomycin을 첨가한 용액을 실험군으로 하여 시간 경과에 따르는 적혈구내의 소듐 함량을 측정하였다.

3. Kanendomycin에 대한 삼투적 깨질성(osmotic fragility)의 변동을 시간경과에 따라 관찰한 실험에서는 kanendomycin 6mg/ml의 생리식염수와 분리한 적혈구를 1:1의 비율로 혼합하여 적혈구 부유액을 만들고 이것을 60, 120 혹은 180분 실온에 방치하였다가 다음과 같이 처리하였다. 상기한 적혈구 부유액 0.15ml씩을 취하여 1/8에서 1/17 M에 이르는 식염수 10ml 속에 넣어 혼합한 후 15분간 원심 침전한 다음 상등액을 취하여 Coleman spectrophotometer 파장 540 m μ 에서 흡광도를 읽고 이를 용혈 표준곡선에서 그 용혈도를 찾아 백분율로 환산하여 나타내었다.

4. Kanendomycin 농도 변화에 따르는 삼투적 깨질성의 변동을 관찰한 실험에서는 kanendomycin의 농도를 1, 3, 6 그리고 10 mg/ml로 변동시킨 적혈구 부유액을 만들어 이들을 실온에 60분간 방치하였다가 앞서와 마찬가지로 각각의 용혈도를 측정하였다.

5. 적혈구 부유액에 kanendomycin과 함께 0.3% albumin (Sigma Co.)이나 5.6% 포도당(Hayashi Co.)을 첨가하여 이 물질들이 삼투적 깨질성에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 kanendomycin 10mg/ml와 생리식염수에 이들 물질을 첨가하여 앞서의 삼투적 깨질성 실험에서와 같이 적혈구 부유액을 만든다음 실온에 120분간 방치하였다가 그 용혈도를 측정하였다.

6. 적혈구 부유액에 kanendomycin과 함께 cysteine (Calbiochem. Co.)이나 glutathione (Nut. Biochem. Corp.)을 첨가하여 K⁺의 유출을 관찰한 실험에서는 kanendomycin 10mg/ml의 생리식염수와 혈구를 9:1의 비율로 혼합한 직후 이 적혈구 부유액의 일부를 취하여 cysteine을 1.2mM, 혹은 glutathione을 1mM 되도록 첨가하고 시간 경과에 따라 이 적혈구내의 K⁺ 함량을 측정하였다.

7. 적혈구 부유액에 kanendomycin 과 함께 EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid, Sigma Co.)이나 p-chloromercuribenzoate (PCMB, Sigma Co.)를 첨가하여 K⁺의 유출을 관찰한 실험에서는 kanendomycin 10 mg/ml의 생리식염수 용액과 혈구를 9:1의 비율로 혼합한 직후 이 적혈구 부유액의 일부를 취하여 EDTA 농도가 8 mM, 혹은 PCMB 농도가 10⁻⁵M 되도록 첨가하고 시간경과에 따라 이 적혈구내 K⁺ 함량을 측정하였다.

8. Kanendomycin 이 적혈구 막에 있어서 Ca⁺⁺결합에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 토끼 적혈구를 분리하여 이를 0°C의 증류수로 10배 희석하여 용혈시킨 다음 Sorvall RC 2-B 원심분리기/10,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 적혈구막을 얻은 다음 이를 50 mM EDTA와 증류수로 각각 세척하고 냉동시켜 12시간 방치한후 냉동된 용액을 다시 녹여서 Sorvall RC 2-B 원심분리기로 20,000×g에서 15분간 원침하고 침전물을 50 mM EDTA 용액으로 세척한 후 2 mM EDTA 용액으로 다시 2번, 이를 또 다시 2 mM Tris (pH 7.4) 용액으로 3번 반복 세척하여서 적혈구막을 얻었다. 그 후 이 적혈구막을 다시 sonifier cell disruptor(Branson Co. Model W 140D)로 60 watt에서 1분간 파괴하여서 적혈구막을 고르게 만들었으며 이 적혈구막 0.5mg씩을 cover glass 상에 옮긴 후에 이를 진공 건조기에 넣고 4°C에서 건조시켜 적혈구막 소편을 얻었다.

다음 cover glass 상에서 건조된 이 적혈구막 소편을 0.05 μci/ml의 ⁴⁵Ca, 10 mM Tris (pH 7.4) 및 0.5, 1, 5, 10 mM로 농도를 달리하는 CaCl₂로 조성된 각 incubation medium 속에 30분간 넣고 Ca⁺⁺(또는 ⁴⁵Ca)을 적혈구막과 결합시켜 이를 대조군으로 하였으며 실험군은 상기한 incubation medium에 kanendomycin을 그 농도가 10 mM 되게 첨가하여 같은 요령으로 실험하였다. Incubation이 끝난 cover glass는 2 mM Tris (pH 7.4) 용액속에 매번 2초씩 5회 넣으므로서 cover glass 상에 부착된 여분의 ⁴⁵Ca를 세척하였으며 마지막으로 cover glass는 실온에서 건조시킨 다음 counting vial 속에 넣고 여기에 scintillation cocktail을 첨가하여 Packard, Tricarb liquid scintillation counter로써 그 방사능을 측정하여 적혈구막에 결합된 Ca⁺⁺양을 구한 다음 이를 비교하였다.

실험 성적

1. 각종 농도의 kanendomycin 용액에 있어서 적혈구 K⁺ 함량의 시간적 변동

농도를 달리한 kanendomycin 생리 식염수용액을 토끼 적혈구막에 작용시킬때 세포내의 K⁺ 함량이 시간 경과에 따라 어떻게 변동하는가를 관찰하고 그 성적을 제 1도에 나타내었다. 이 도에서 보는 바와 같이 kanendomycin의 농도가 높을수록 K⁺의 함량감소는 더욱 뚜렷하였다. 적혈구의 K⁺함량이 감소하는 경과를 보면 kanendomycin을 작용시킨후 60분까지는 빠르게, 그 이후에는 비교적 느리게 감소하는 것을 볼 수 있었다.

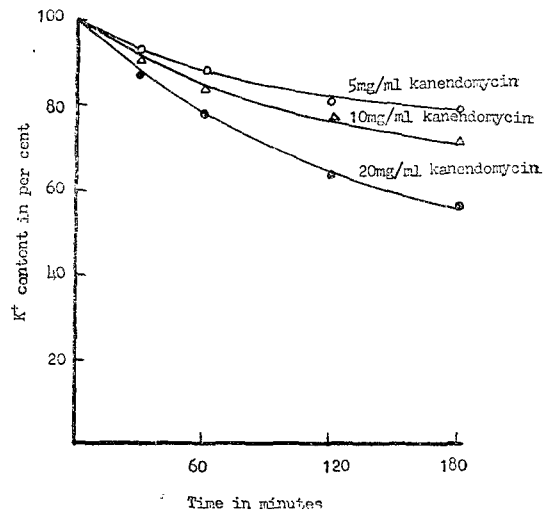


Fig. 1. Time course of the change in K⁺ content of rabbit erythrocytes treated with varying concentration of kanendomycin.

2. Kanendomycin 10 mg/ml 용액에 있어서 적혈구 Na⁺함량의 시간적 변동

이 실험에 있어서는 kanendomycin 10 mg/ml의 생리식염수 용액을 적혈구에 작용시킬때 세포내의 Na⁺ 함량이 시간적으로 어떻게 변동하는가를 관찰하였다.

그 성적은 제 2도에 보는 바와 같이 시간 경과에 따라 Na⁺함량이 점차 증가하였는데 180분후에는 31.5%가 증가하였다.

3. Kanendomycin의 작용시간 경과에 따른 적혈구의 삼투적 깨질성의 변화

Kanendomycin에 의한 삼투적 깨질성의 변동을 사

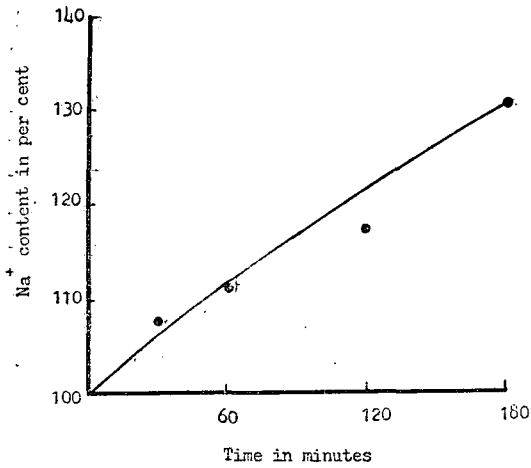


Fig. 2. Time course of the change in Na⁺ content of rabbit erythrocytes at the concentration of 10 mg/ml kanendomycin.

간 경과에 따라 관찰한 것이다. 적혈구에 6 mg/ml의 kanendomycin 을 60, 120 혹은 180분 작용시켰던바 제 3 도에서 보는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 삼투적 깨질성 곡선은 고장액측인 우측으로 이동하여 삼투적 용혈이 증가하는 현상을 알 수 있었다.

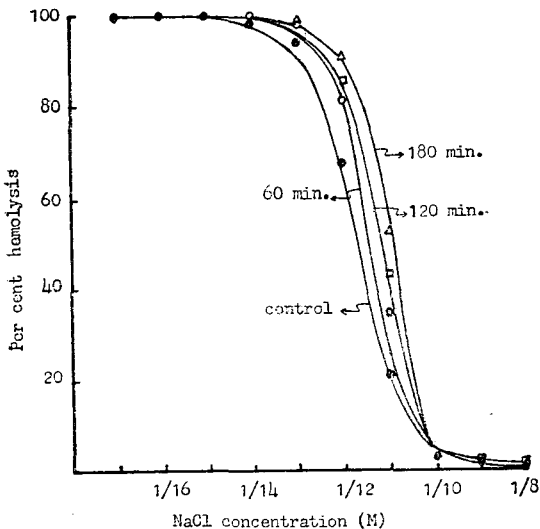


Fig. 3. Osmotic fragility curves of the rabbit erythrocytes treated with 6 mg/ml kanendomycin for 60, 120, or 180 minutes.

4. Kanendomycin 의 농도 변동이 적혈구의 삼투적 깨질성에 미치는 효과

이 실험에 있어서는 kanendomycin 의 농도를 변동시켜 적혈구의 삼투적 깨질성을 관찰한 것이다.

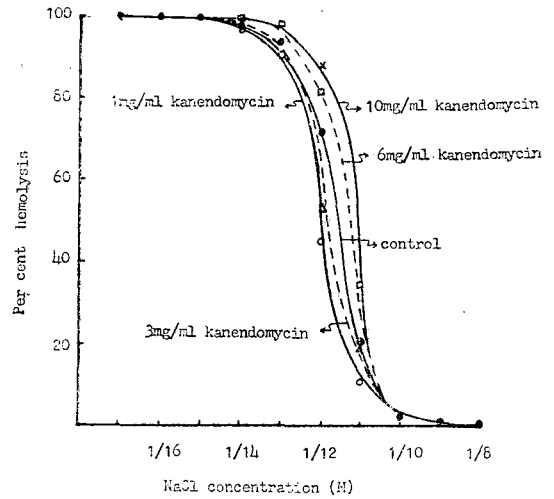


Fig. 4. Osmotic fragility curves of the rabbit erythrocytes treated with varying concentration of kanendomycin for 60 minutes.

그 성적을 제 4 도에 표시하였다. 제 4 도에서 보는바와 같이 kanendomycin 의 농도를 6 mg/ml 에서 10 mg/ml로 변동시킴에 따라 삼투적 용혈은 더욱 증가하여 삼투적 저항이 약화 되었으나 농도를 3 mg/ml에서 1 mg/ml로 저하함에 따라 삼투적 용혈은 오히려 감소하여 삼투적 저항이 강화됨을 볼 수 있다.

5. Albumin 및 포도당이 적혈구의 삼투적 저항에 대한 kanendomycin 의 효과에 미치는 영향

이 실험에 있어서는 kanendomycin 1) mg/ml의 생리식염수 용액으로 0.3% albumin 이나, 5.6% 포도당 용액을 만들어 각각 이 용액으로 120분간 작용시킨 적혈구에 대하여 그 삼투적 깨질성을 관찰하고 그 결과를 제 5 도에 나타내었다.

여기서 보는 바와 같이 albumin 은 kanendomycin에 의한 삼투적 저항의 약화를 다소 감소시키나 포도당은 별 영향을 주지 아니하였다.

6. Cysteine 과 glutathione O) kanendomycin 에 의한 적혈구 K⁺ 감소에 미치는 효과

이 실험에 있어서는 kanendomycin 에 의한 적혈구의

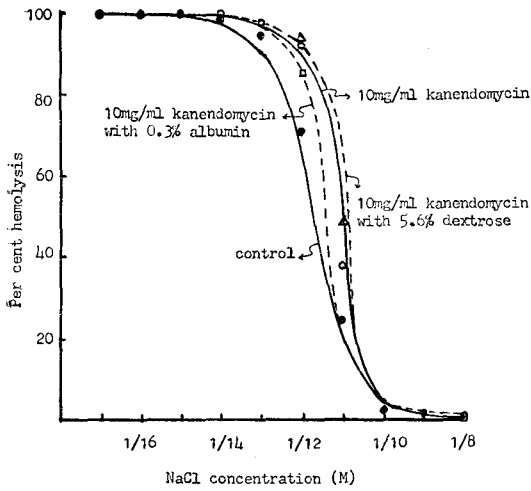


Fig. 5. Effects of albumin and dextrose on the osmotic fragility curves of the rabbit erythrocytes treated with 10 mg/ml kanendomycin for 120 minutes.

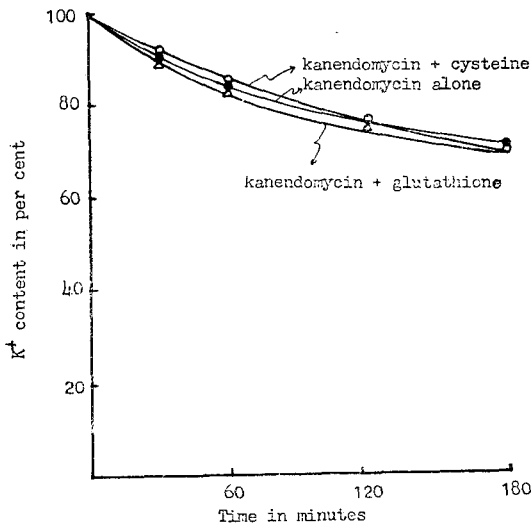


Fig. 6. Time course of the change in K^+ content of rabbit erythrocytes treated with kanendomycin alone, with kanendomycin plus cysteine and with kanendomycin plus glutathione.

K^+ 감소가 세포막에 있는 SH-기와 같은 유효기와 작용하여 일어나는지 여부를 관찰하였다.

Kanendomycin 10 mg/ml의 생리 식염수 용액에 적혈구를 부유시킨 직후에 그 부유액의 일부를 취하여

cysteine을 1.2 mM 되도록, 혹은 glutathione의 농도가 1 mM 되도록 첨가하고 시간 경과에 따르는 적혈구 K^+ 함량의 변동을 관찰하고 그 성적을 제 6도에 나타내었다. Cysteine이나 glutathione의 첨가는 kanendomycin에 의한 적혈구의 K^+ 함량의 감소에 별 영향을 주지 아니함을 알 수 있었다.

7. EDTA와 PCMB가 kanendomycin에 의한 적혈구 K^+ 감소에 미치는 효과

이 실험에 있어서는 kanendomycin 10 mg/ml의 생리식염수 용액에 적혈구를 부유시킨 직후에 그 부유액의 일부를 취하여 EDTA를 8 mM 되도록, 혹은 PCMB의 농도가 $10^{-8}M$ 되도록 첨가하고 시간 경과에 따르는 적혈구 K^+ 함량의 변동을 관찰하였고 그 성적을 제 7도에 나타내었다. 여기서 보는바와 같이 EDTA의 첨가는 별 영향을 주지 아니하였으나 PCMB의 첨가는 kanendomycin에 의한 적혈구의 K^+ 유출을 다소 더욱 증가시킴을 알 수 있다.

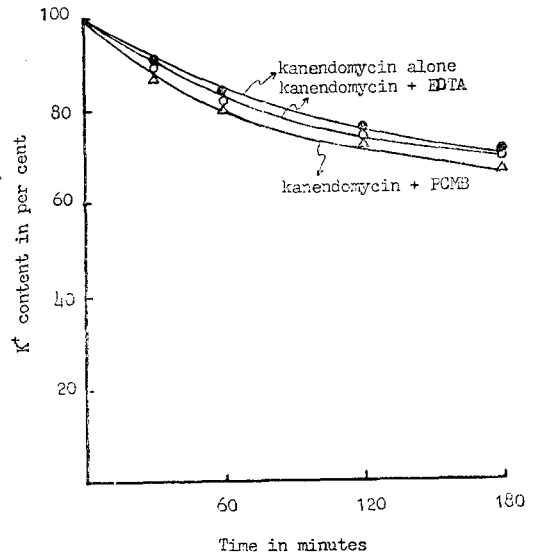


Fig. 7. Time course of the change in K^+ content of rabbit erythrocytes treated with kanendomycin alone, with kanendomycin plus EDTA and with kanendomycin plus PCMB.

8. Kanendomycin이 적혈구막에 있어서 Ca^{++} 결합에 미치는 영향

이 실험에 있어서는 kanendomycin이 적혈구막에서 Ca^{++} 결합에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하였는데

제 1 표에서 보는 바와 같이 0.5 mM CaCl₂를 포함한 medium에 있어서의 결합된 Ca⁺⁺는 대조군에서 2.48 × 10⁻³ μM이었으며 kanendomycin 투여군에서는 7.59 × 10⁻⁴ μM이었고, medium 내의 CaCl₂ 농도가 1 mM일 때 대조군은 4.26 × 10⁻³ μM이었고, kanendomycin 투여군에서는 14.1 × 10⁻⁴ μM이었다. 이와 같이 CaCl₂의 농도를 변화시켰을때의 성적을 Lineweaver-Burk plot로 표시하여 제 8도에 나타내었다. 여기서 보는 바와 같이 두 직선이 Y축상에서 교차하였다.

이와 같은 성적으로 미루어 보아 kanendomycin은 적혈구막에 대하여 Ca⁺⁺과 서로 경쟁적으로 결합한다는 것을 알 수 있었다.

제 1 표 Kanendomycin 에 의한 Ca⁺⁺ 결합 억제 양상

CaCl ₂ 농도 (mM)	대 조 군 (결합한 Ca ⁺⁺ 량) × 10 ⁻³ μM	Kanendomycin 10mM 투여군 (결합한 Ca ⁺⁺ 량) × 10 ⁻⁴ μM
0.5	2.48	7.59
1	4.26	14.1
5	11.5	55.9
10	14.4	96.4

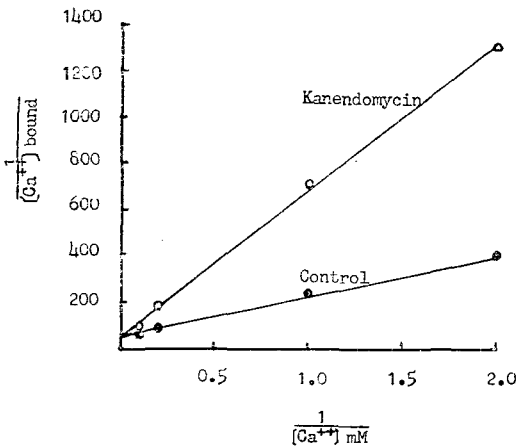


Fig. 8. Competitive inhibition of Ca⁺⁺ binding to erythrocyte membrane fragments by kanendomycin.

고 찰

적혈구나 신경세포막에서 K⁺은 세포막 안으로, Na⁺은 세포막 밖으로 펌프작용에 의하여 능동적으로 이동되고 있으며, 이러한 Na⁺과 K⁺의 능동적 이동에는 해당 과정에서 유리되는 에너지를 필요로 하며^{1,2}, 생체

막에 존재하는 Na⁺과 K⁺에 의하여 활성화되는 소위 Na⁺-K⁺ activated ATPase¹⁷가 이러한 양 이온의 능동적인 이동에 carrier mechanism을 이루고 있는 것으로 믿고 있다¹⁸.

적혈구에 미량의 중금속 이온을 작용시키면 세포내의 K⁺이 유출되어 나오며¹⁹ 중금속 이온은 그 화학적 친화력에 따라서 세포막에 있는 유효기와 특이적으로 결합하여 세포막의 이온에 대한 투과성을 변화시키며, 중금속 이온이 세포막의 유효기와 결합하는 기전은 대단히 복잡하며 동물의 세포의 종류에 따라서 차이가 심하다 함은 잘 알려져 있는 사실이다²⁰.

Kanamycin을 비롯한 이 중독성 항생제들은 일반적으로 나선신경세포, 청신경 섬유, 모세관의 내피세포 및 막와우의 병변과 내림파압에도 변화를 초래한다고 한다.

이 중독성 항생제가 청력장애를 일으키는 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았는데 지금까지 추측되고 있는 여러 학자들의 업적들은 이들 약물이 조직의 호기성 대사를 억제하고^{8,9,21,22}, 생체막에 있어서의 투과성을 변화시키며^{14,15}, 나아가서는 세포내 단백질 합성에도 영향을 미친다는 것이다.

Iinuma 등¹²이나 Askari 및 Rao¹³와 Cha 등²³은 Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺들의 전해질 대사와 ATPase의 활성화와는 밀접한 관계가 있으며 이 ATPase가 kanamycin에 의하여 억제되었다고 한다. 이로 미루어 보아 kanamycin과 같은 내이 중독성 약물은 내이 조직의 호기성 또는 ATP대사를 억제할 뿐 아니라 동시에 전해질 이동에도 장애를 일으켜 세포막을 포함한 세포 내액에 변화를 초래할 것이라고 짐작된다.

그래서 저자는 kanamycin과 유사한 이 중독성 약물이며, 독성이 적고 항균작용이 강한 최근에 개발된 kanendomycin이 토끼 적혈구막의 K⁺ 투과에 미치는 영향과 이에 관련된 몇가지 실험을 통하여 이의 작용 기전의 일단을 추구하고자 하였다.

각종 농도의 kanendomycin 용액에 있어서 적혈구 K⁺ 함량의 시간적 변동을 관찰한 실험에서 kanendomycin은 K⁺ 유출을 일으키며 kanendomycin의 농도 증가에 따라 K⁺ 유출도 증가되었다. 이와 같은 현상은 중금속이나¹⁹, NaF²⁴가 사람 적혈구에 작용하여 실무울에 따라서 K⁺ 유출을 일으킨다는 사실과 부합되는지는 추단키 어렵다. 그리고 kanendomycin을 처치한 적혈구에 있어서 소량의 세포내로의 유입을 관찰한 실험에서 작용시간 경과에 따라서 점차 증가하였다. 이와 같은 실험결과는 kanendomycin은 세포막에 있는

ATPase 를 억제시킨다는 사실과^{12,13)}, Mendelsohn 및 Katzenberg²⁵⁾가 kanamycin 이 생체막에서의 ATPase 활성도를 억제함으로 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump 를 차단하고 수동적 양이온의 투과성이 증가되기 때문에 Na^+ 의 세포내로의 투과성이 높아진다는 보고와 일치된다고 하겠다.

그런데 Chappell 및 Crofts²⁶⁾와 Henderson 등¹⁴⁾이나 Guerra 등¹⁵⁾은 gramicidin 이나 oligomycin 등 항생제가 생체막의 양이온 투과성을 증가시키는 기전을 이들 항생물질들은 세포막이나 또는 인공적인 phospholipid 막의 작은 구멍(pores)의 크기를 변화시키는 것으로 설명하였고, Pressman 등²⁷⁾은 이들 항생물질이 양이온과 결합하여 세포막 또는 생체막내의 성분속에 잘 용해되는 합성물을 만들어 일단 막을 통과한 후에는 다시 양이온을 유리시키기 때문에 양이온의 이동이 일어난다고 하였다. 그런데 kanendomycin 도 이들 항생제처럼 세포막의 구멍의 크기를 증가시키는지는 본 실험으로는 짐작키 어렵다고 본다.

Kanendomycin 이 적혈구의 삼투적 깨질성에 미치는 효과를 관찰한 실험에서 적혈구에 이 약물을 60분, 120분, 180분간 작용시킨 시간이 오래 경과할수록 삼투적 깨질성 곡선은 우하방으로 이동하여 삼투적 저항은 더욱 약화되었다. 그리고 kanendomycin 의 농도를 1, 3, 6 그리고 10 mg/ml 로 증가하여 삼투적 용혈을 관찰하였던 바 제 4 도에 보는 바와 같이 6에서 10 mg/ml 로 농도 증가에 따라 대조군 보다 더욱 삼투적 저항이 약화되었고, 3에서 1 mg/ml 로 농도를 감소함에 따라 삼투적 저항은 강화되었다.

Seeman^{28,29)}은 steroid 나 alcohol 그리고 안정제나 마취제등 여러가지 약물이 신경세포막 뿐 아니라 다른 생체막에 대해서도 그 농도를 적절히 조절할때에 세포막의 안정성을 증가시켜 준다고 하였고 안정제인 chlorpromazine 의 경우에는 $6 \times 10^{-4} \text{M}$ 농도에서 적혈구의 삼투성 용혈이 억제되었음을 보았고, 이보다 낮거나 높은 농도에서는 다시 용혈이 시작된다고 하였는데 이와 유사한 결과는 Greig 와 Gibbons³⁰⁾, Judah³¹⁾, Guth 등³²⁾ 및 Bangham 등³³⁾에 의해서도 보고된 바 있다. 더욱이 Judah 는 chlorpromazine 이나 vitamin A 와 같은 약물이 다른 여러 약물에 의하여 초래된 mitochondria 의 팽대를 억제시켰으며³¹⁾, 간 lysosome 으로부터 acid phosphatase 가 유출되는 것을 억제시킴을 관찰하였다고 한다³⁴⁾.

이와 같이 여러 종류의 약물들은 저 농도에서 생체막의 안정성을 증가시켜주나, 고농도에서는 안정성

이 점차로 약화되어 결국 생체막을 파괴시킴을 알 수 있다.

저자의 실험에서도 저농도의 kanendomycin 은 삼투적 저항을 강화하여 적혈구막의 안정성을 증가시켜 주며, 고 농도에서는 삼투적 용혈이 증가되어 적혈구막의 안정성이 약화되는 것으로 사료된다.

그런데 kanamycin 을 사람 적혈구에 작용시켰을 때 그 농도에 비례하여 고농도에서도 삼투적 용혈이 억제되었다고 하는데¹⁶⁾, 이와 같은 현상은 다른 세포막 안정제들과는 다른 요인이 존재하는 것으로 간주된다.

Cysteine, glutathione, EDTA 나 PCMB 가 kanendomycin 에 의한 적혈구 K^+ 감소에 미치는 효과를 관찰한 실험에서 이들 물질중 PCMB 를 제외하고는 kanendomycin 에 의한 적혈구 K^+ 감소에 아무런 효과를 주지 아니하였음은 kanendomycin 에 의한 K^+ 유출은 중금속 이온과는 달리 세포막에 있는 유효기와 특이하게 결합하여 초래되지 아니함을 암시하며, PCMB에 의하여 다소 K^+ 유출이 더 증가함은 PCMB 는 SH- inhibitor 이기 때문에 세포막에 있는 SH-기를 억제하므로서 K^+ 의 세포밖으로의 투과가 증가된 것으로 해석된다.

Kanendomycin 이 적혈구막 소편에서 Ca^{++} 결합에 미치는 영향을 ^{45}Ca 을 이용하여 추적한 실험에서 그 결과를 Lineweaver-Burk plot 로 표시하였던 바 제 8 도에서 보는 바와 같이 두 직선이 Y축상에서 교차되므로 그 양상은 국소마취제가 Ca^{++} 과 서로 경쟁적으로 생체막과 결합한다는 Blaustein³⁵⁾이나 Kwant 및 Seeman³⁶⁾의 보고와 유사하였다. Blaustein 및 Goldman³⁷⁾과 Kwant 및 Seeman³⁶⁾은 국소마취제들이 Ca^{++} 결합을 경쟁적으로 억제함은 Ca^{++} 과 결합되는 생체막의 phospholipid 내의 장소를 국소 마취제의 분자들이 점유하기 때문에 결과적으로 Ca^{++} 과의 결합이 억제되며, 그 억제 정도는 국소 마취제의 강도에 따라서 다르다고 하였다.

본 실험에서도 kanendomycin 이 Ca^{++} 결합을 억제하는 것으로 보아 이 약물도 국소마취제와 마찬가지로 생체막의 phospholipid 내의 Ca^{++} 이 결합되는 장소에서 결합될 것이라 추정된다.

이상의 실험성적을 종합하여 보면 kanendomycin 은 적혈구막에 작용하여 Na^+ 과 K^+ 의 투과성을 증가시키고 저 농도에서는 적혈구막의 안정성을 강화시키고, 세포막에 작용하는때는 중금속 이온과는 그 기전을 달리 하며, 적혈구막의 Ca^{++} 의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것으로 사료된다.

결 론

토끼 적혈구막에 kanendomycin 을 작용시켰을때 K⁺의 유출이 일어나는 것을 관찰하고 나아가 몇가지 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 적혈구에 kanendomycin 을 작용시키면 K⁺은 세포 밖으로 유출하고 Na⁺은 세포내로 유입하였다.
2. Kanendomycin 으로 처리된 적혈구는 삼투적 저항이 약화되었으며, 이러한 현상은 kanendomycin 의 농도 증가와 작용시간 경과에 따라 더욱 현저 하였다. 그러나 저 농도에서는 오히려 삼투적 저항이 증강되었다.
3. Cysteine 이나 glutathione 은 kanendomycin 에 의한 적혈구의 K⁺ 유출에 영향을 주지 아니하였다.
4. EDTA 는 kanendomycin 에 의한 적혈구의 K⁺ 유출에 영향을 주지 아니하였으나, PCMB 는 오히려 K⁺ 유출을 증가시켰다.
5. Kanendomycin 은 토끼 적혈구막 소편에서 상경적으로 Ca⁺⁺의 결합을 억제하였다.

REFERENCES

- 1) Glynn, I. M. : *The ionic permeability of the red cell membrane. Progress in Biophysics* 8:241, 1957.
- 2) Hoffmann, J. F. : *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Fed. Proc.*, 19:127, 1960.
- 3) Sen, A. K. and Post, R. L. : *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem.*, 239:345, 1964.
- 4) Umezawa, H. : *Kanamycin: Its discovery. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 76:20, 1958.
- 5) Cronk, G. A. and Nauman, D. E. : *The absorption and excretion of kanamycin in human body. J. Lab. Clin. Med.*, 53:888, 1959.
- 6) Gale, E. F. : *Mechanism of antibiotics action. Pharmacol. Rev.*, 15:481, 1963.
- 7) Stupp, H., Rauch, S., Sons, H. and Lagler, F. : *Untersuchungen über die Ursache der Spezifisch Ototoxischen Wirkung der Basischen Streptomycetes Antibiotika unter Besonderes Berücksichtigung des Kanamycin. Acta Otolaryng.*, 61:435, 1966.
- 8) El-Mofty, A. and El-Serafy, S. : *The effect of ototoxic antibiotics on the oxygen uptake of the membranous cochlea. Ann. Otol. Rhin. Laryng.*, 75:216, 1966.
- 9) Mizukoshi, O. and Daly, J. F. : *Oxygen consumption in normal and kanamycin damaged cochlea. Acta otolaryng.*, 64:45, 1967.
- 10) Ishiyama, I. : *Succinic dehydrogenase in the pigeon ampulla. Arch. of otolaryng.*, 90:5, 1969.
- 11) Glynn, I. M. : *The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev.*, 16:381, 1964.
- 12) Inuma, T., Mizukoshi, O. and Daly, J. F. : *Possible effects of various ototoxic drugs upon the ATP-hydrolyzing system in the stria vascularis and spiral ligament of the guinea pigs. Laryngoscope*, 77:159, 1967.
- 13) Askari, A. and Rao, S. N. : *Drugs affecting sodium transport in human erythrocyte ghosts. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172:211, 1970.
- 14) Henderson, P. J.: McGivan, J. D. and Chappell, J. B. : *The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid membranes. Biochem. J.*, 111:521, 1969.
- 15) Guerra, L., Klahr, S., Beauman, W., Marchena, G., Bourgoignie, J. and Bricker, N. S. : *Effects of oligomycin on anaerobic sodium transport and metabolism in shark erythrocytes. Am. J. Physiol.*, 217:1292, 1969.
- 16) 홍원표 : *Kanamycin 이 적혈구 막에 미치는 영향. 연세대의대 논문집*, 6:158, 1973.
- 17) Skou, J. C. : *The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta* 23:394, 1957.
- 18) Skou, J. C. : *Enzymatic basis for the active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. Physiol. Rev.*, 45:596, 1965.
- 19) Passow, H. and Tillmann, K. : *Untersuchungen über den Kaliumverlust bleivergifteter Menschenerythrocyten. Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 262:23, 1956.

- 20) Passow, H., Rothstein, A. and Clarkson, T. W. : *The general pharmacology of the heavy metals. Pharmacol. Rev.*, 13:185, 1961.
- 21) Koide, Y., Hata, A. and Hando, R. : *Vulnerability of the organ of corti in poisoning. Acta Otolaryng.*, 61:332, 1966.
- 22) 白基佑 : Kanamycin 과 Kanendomycin 이 백서 간의 mitochondria 의 oxidative phosphorylation 에 미치는 영향. 연세의대 논문집, 3:87. 1970.
- 23) Cha, Y. N., Shin, B. C. and Lee, K. S. : *Active uptake of Ca^{++} and Ca^{++} -activated Mg^{++} ATPase in red cell membrane fragments. J. Gen. Physiol.*, 57:202, 1971.
- 24) Eckel, R. E. : *Potassium exchange in human erythrocytes. I. General aspects of the fluoride effect. J. Cell. Comp. Physiol.*, 51:81, 1958.
- 25) Mendelsohn, M. and Katzenberg, I. : *The effect of kanamycin on the cation content of the endolymph. Laryngoscope*, 82:397, 1972.
- 26) Chappell, J. B. and Crofts, A. R. : *Gramicidin and ion transport in isolated liver mitochondria. Biochem. J.*, 95:393, 1965.
- 27) Pressman, B. C., Harris, E. J., Jagger, W. S. and Johnson, J. H. : *Antibiotics induced cation permeability in mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58:1949, 1967.
- 28) Seeman, P. M. : *Erythrocyte membrane stabilization by steroid and alcohol. A possible model for anesthesia. Biochem. Pharmacol.*, 15:1632, 1966.
- 29) Seeman, P. M. : *Membrane stabilization by drugs: Tranquilizer, steroid, and anesthetics. Int. Rev. Neurobiol.*, 9:145, 1966.
- 30) Greig, M. and Gibbons, J. : *Possible mechanism of action by which phenothiazine derivatives preserve stored blood. Am. J. Physiol.*, 181:313, 1955.
- 31) Judah, J. D. : *Action of antihistamine drugs in vitro. 1. Mitochondrial swelling. Biochim. Biophys. Acta* 53:375, 1961.
- 32) Guth, P. S., Sellinger, O. Z., Amaro, J. and Elmer, L. : *Additional permeability effects by chlorpromazine: Leakage of lysosomal phosphatase. Federation Proc.*, 22:626, 1963.
- 33) Bangham, A. D., Dingle, J. T. and Lucy, J. A. : *Studies on the mode of action of excess of vitamin A. Biochem. J.*, 90:133, 1964.
- 34) Judah, J. D. : "Drugs and enzyme", CIBA symposium. P.359, Little Brown, Boston, Massachusetts, 1962.
- 35) Blaustein, M. P. : *Phospholipids as ion exchangers: Implications for a possible role in biological membrane excitability and anesthesia. Biochim. Biophys. Acta* 135, 653, 1967.
- 36) Kwant, W. O. and Seeman, P. : *The displacement of membrane calcium by a local anesthetics (chlorpromazine). Biochim. Biophys. Acta* 193: 338, 1969.
- 37) Blaustein, M. P. and Goldman, D. E. : *Competition action of calcium and procaine on lobster axon. "A study of the mechanism of action of certain local anesthetics". J. Gen. Physiol.*, 49:1043, 1966.