大韓藥理學雜誌 : 第19卷 第1號
Korean J. of Pharmacology
Volume 19, Number 1, 1983

Vanadium이 신장 Na-K-ATPase에 미치는 영향

가톨릭의과대학 약리학교실

김 인 순 · 이 상 복 · 조 규 철

= Abstract =

The Effect of Sodium Orthovanadate on Renal Na-K-ATPase Activity and Renal Function in Rabbits

I.S. Kim, S.B. Lee and K.C. Cho

Department of Pharmacology, Catholic Medical College, Seoul, Korea

Vanadium is widely distributed in animal tissues and it is supposed to be a regulator of Na-K-ATPase activity. The effect of sodium orthovanadate on Na-K-ATPase activity in rabbit kidney was measured in vitro and compared with that of ouabain. The influence of sodium orthovanadate on the renal function of rabbits was also investigated.

1) Na-K-ATPase activity was decreased by sodium orthovandate at the concentrations of 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} and 10^{-4} M to 73.89, 36.49, 6.50 and 4.99% of the control activity respectively.

2) Na-K-ATPase activity was decreased by ouabain at the concentrations of 10^{-4}, 10^{-3} and 10^{-2} M to 69.52, 22.84 and 3.88% of the control activity respectively.

3) Urine volume, urinary excretion of Na^+, K^+ and Cl^-, clearances of inulin and *p*-aminohoppuric acid were decreased until after 60 minutes following the administration of sodium orthovanadate 0.5 mg/kg intravenously. Na^+ reabsorption rate was not changed and mean arterial pressure was significantly elevated during 60 minutes after the administration of sodium orthovanadate.

서 론

포유류 신세뇨관 세포의 microsomal fraction은 특히 Na-K-ATPase 활성이 높으며, Na^+수송은 신세뇨관 세포의 기저와 측면에 존재하는 이 효소의 활성에 따라 달라진다(Glynn & Karlish, 1975). 신조직에서 Na-K-ATPase 억제작용이 있는 제제들이 많이 발견되었으며 이들과 이뇨작용과의 상관관계에 대해서 보고된 논문들이 많다.

동물조직에 미량으로 널리 분포되어 있는 vanadium (Underwood, 1977)은 여러 학자들에 의해 강력한 Na-K-ATPase 억제작용이 있음이 밝혀졌으며 (Cantley et al., 1977; Nechay & Saunders, 1978; Nieder et al., 1979), 여러 동물의 여러 기관에서 이 효소활성에 대한 효과가 연구되었다.

Balfour 들(1978)과 Roman 들(1981)은 흰쥐에서 vanadium의 정맥내 투여로 이뇨작용이 일어남을 보았으며, Kumar와 Corder(1980)는 흰쥐의 적출신장에서 vanadium에 의한 이뇨작용이 vanadium의 농도에 비례함을 관찰하여 이들이 모두 신세뇨관 세포의 Na-K-ATPase 활성을 억제하여 Na^+재흡수가 감소되기 때문이라 하였다. 그러나 다른 동물에서 신기능에 대한 vanadium의 효과는 흰쥐에서와는 다르게 나타났다. Jackson(1911~1912)은 소량의 vanadium이 사람과 다른 동물에서 요량을 증가시킴을 보고하였으나,

* 이 연구는 1982년도 문교부 연구조성비 및 가톨릭 중앙의료원 연구보조비로 이루어진 것임.

최근의 마취된 개(Mills & Newport, 1979)와 고양이(Larsen et al., 1979)의 실험에서 보면 sodium orthovanadate가 현저한 혈관수축과 사구체 여과율의 감소를 일으켜 심한 항이뇨 작용을 나타냄을 볼 수 있다.

토끼에서는 vanadium에 의한 신기능의 변화에 대한 보고가 없으므로, 토끼 신장의 microsomal fraction에서 Na-K-ATPase 활성에 대한 sodium orthovanadate의 영향을 측정하고, 정맥내 주입시 신기능에 어떠한 변화를 일으키는지 관찰하였다.

재료 및 방법

1) 시험관내 Na-K-ATPase 활성의 측정

토끼를 출혈 치사시켜 신장을 적출하였다. 10 vol/wt의 5 mM EDTA, 0.1% sodium deoxycholate, 30 mM Tris-HCl을 함유하는 0.25M sucrose 용액(pH 7.5)을 가하고 teflon homogenizer를 사용하여 4°C 이하에서 homogenize 하였다. 여기에서 얻어진 homogenate를 2겹의 gauze로 여과한 후 10,800 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 다시 39,100 g에서 30분간 원심분리하였다. 여기에서 얻어진 heavy microsomal fraction을 0.25 M sucrose, 5 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl 용액에 resuspension시켜 −20°C 이하에 보관하였다(Katz, 1967). 원심분리는 Hitachi Model 65 P ultracentrifuge를 사용하여 4°C에서실시하였다.

Microsomal fraction은 사용시에 단백질 함량이 100 μg/ml 내외가 되도록 하였으며 단백량의 측정은 Lowry법(1951)에 의거하였다. Na-K-ATPase 활성의 측정을 위해 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM imidazole buffer가 든 반응액(pH 7.5)에 0.3 ml의 microsomal suspension을 첨가하여 37°C 항온 수욕조상에서 3분간 preincubation시켰다. 여기에 5 mM Tris-ATP 0.2 ml를 가하여 반응액의 전량이 5 ml가 되게하고 37°C waterbath-shaker에서 5분간 반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해 ice-cold 35% trichloroacetic acid 1 ml를 가하고 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후, 여기에 유리되어 나온 무기인의 함량을 Fiske & Subbarow 방법(1925)으로 측정하였다. Na-K-ATPase 활성도는, 반응액 중에 K^+이 존재할 때 유리된 무기인의 함량에서 K^+이 존재하지 않을 때의 값을 빼어 계산하고 μM Pi/mg protein/hr로 표시하였다.

반응액의 성분외에 아무것도 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하고, 반응액에 sodium orthovanadate (Na_3VO_4) 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M을 첨가하여 Na-K-ATPase 활성을 측정하였으며 ouabain 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}M 첨가시의 활성도와 비교하였다.

2) 신기능과 혈압의 측정

실험동물은 체중 2 kg 내외의 건강한 토끼를 암수 구별없이 사용하였으며 25% urethan 용액 5 ml/kg을 복강내에 주사하여 마취시켰다. 좌측 대퇴정맥으로는 0.3% inulin 및 0.04% PAH를 함유한 생리 식염수를 0.5 ml/min/kg의 속도로 주입하였으며, 좌측 대퇴동맥에 heparim 용액(100 unit/ml)이 든 catheter를 삽입하고 필요에 따라 채혈하도록 하였다. 우측 대퇴동맥을 노출하여 polyethylene tube(No. 19)를 삽입하고, 압력 transducer를 혈압증폭기에 연결하여 biophysiograph(San-ei Instrument Co., 일본, Type 5108)로 혈압을 측정하였다. 양쪽 수뇨관에는 catheter를 삽입하여 좌우 합해서 집뇨하였다.

수술조작이 끝나고 요량이 일정해지면 prime dose (inulin 35 mg/kg과 PAH 3.5 mg/kg을 생리 식염수 1 ml에 용해)를 주사하였다. 15분 간격으로 3번 대조실험뇨를 받고 sodium orthovanadate 0.5 mg/kg을 5분간에 걸쳐 정맥내에 주사하였다. 약물 투여후 15분, 30분, 45분, 60분 경과시까지의 소변을 각각 채취하고 채혈은 집뇨중간에 행하였다.

요 및 혈액중의 Na^+, K^+농도는 flame photometer (Instrumentation Lab., 미국, I.L. 143)로, Cl^-는 chloridometer(Buchler-Cotlove Instrument, 미국)로 측정하였다. Inulin 측정은 Schreiner(1950) 방법으로, PAH 측정은 Smith 등(1945)의 방법에 의하였다.

성 적

1) 시험관내 Na-K-ATPase 활성의 측정

(1) Sodium orthovandate 처치에 의한 변화 : 대조군인 정상토끼의 Na-K-ATPase 활성은 30.45 μM Pi/mg protein/hr 이었으며 sodium orthovanadate 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M의 처치에 따라 효소활성이 각각 대조군의 73.89, 36.49, 6.50, 4.99%로 현저히 억제되어 나타났다(그림 1 참조).

(2) Ouabain 처치에 의한 변화 : 대조군의 Na-K-ATPase 활성은 30.12 μM Pi/mg protein/hr 이었으며 ouabain 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}M의 처치에 따라 효소활성이 대조군의 각각 69.52, 22.84, 3.88%로 유의하게

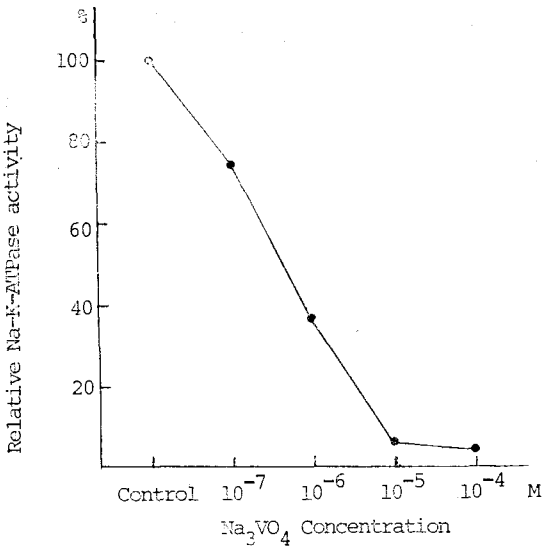

Fig. 1. Sodium orthovanadate inhibition of Na-K-ATPase activity of rabbit renal homogenate (number of experiments = 7)

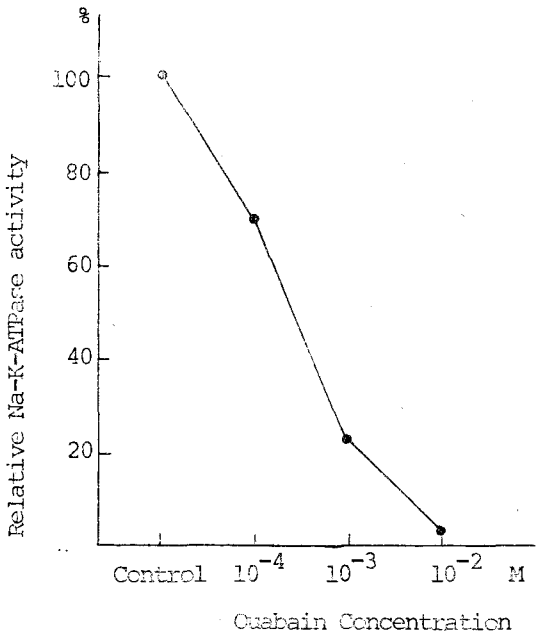

Fig. 2. Ouabain inhibition of Na-K-ATPase activity of rabbit renal homogenate (number of experiments = 6)

Table 1. Effect of sodium orthovanadate (0.5 mg/kg/5 min i.v.) on the renal function in rabbits

Time (min)	U_{vol} (ml/min)	$U_{Na}V$ (μEq/min)	U_KV (μEq/min)	$U_{Cl}V$ (μEq/min)
Control	0.28±0.06	34.38±8.99	4.25±0.51	36.11±10.45
0~15	0.18±0.04**	21.25±4.73**	3.57±0.39*	22.49±5.68**
15~30	0.19±0.05**	22.24±4.49**	3.64±0.48*	24.33±6.03*
30~45	0.18±0.05**	21.92±6.15**	3.68±0.54	25.47±7.06*
45~60	0.17±0.06**	25.33±6.28*	3.88±0.42	26.02±6.65*

Mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Number of rabbits = 14

Table 2. Effect of sodium orthovanadate (0.5 mg/kg/5 min i.v.) on renal hemodynamics and mean arterial pressure (MAP) in anesthetized rabbits

Time (min)	C_{In} (ml/min)	C_{PAH} (ml/min)	Na^+reab. rate (%)	MAP (mmHg)
Control	11.84±2.11	32.20±6.06	97.74±0.58	112±8.8
0~15	7.11±1.42***	23.73±4.04**	97.88±0.57	138±9.6***
15~30	6.07±2.86**	20.77±6.24*	95.05±3.89	121±10.1**
30~45	7.65±1.32***	16.73±4.69***	97.41±1.51	135±11.4***
45~60	7.39±2.23**	20.02±6.44**	97.11±1.22	129±11.6**

Mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Number of rabbits = 14

억제되었다(그림 2 참조).

2) 신기능과 혈압의 측정

(1) 요량과 요중 전해질 배설량 : Sodium orthovanadate 0.5 mg/kg을 5분간에 걸쳐 정맥내 주입시 요량과 요중 Na^+, Cl^-배설량이 60분 경과시까지 유의하게 감소되었으며, 요중 K^+배설도 억제되어 30분 경과시까지는 유의한 차이를 나타내었다(표 1 참조).

(2) 신혈류역학과 전신혈압의 변화 : Sodium orthovanadate 0.5 mg/kg/5min의 정맥주입으로 60분 경과시까지 GFR과 RPF의 뚜렷한 감소를 보였으며, 신세뇨관 세포에서의 Na^+재흡수율에는 유의한 차이가 없었다. 평균 동맥혈압은 sodium orthovanadate 투여로 60분 경과시까지 유의하게 증가되었다(표 2 참조).

고 찰

신장에 작용하는 약물의 기전을 보면 혈류역학적인 변화를 일으키는 것과 신세뇨관에 직접 작용하는 두가지로 대별할 수 있다. 혈류역학적인 변화는 GFR 및 RPF로 판정되며, 신세뇨관 세포에 대한 작용기전 중의 하나로서 Na-K-ATPase가 양이온의 재흡수에 중요한 역할을 하는 것은 널리 알려진 사실이다(Skou, 1965; Katz & Epstein, 1968).

본 실험 성적에서 보면 시험관내에서 신조직내 Na-K-ATPase 활성에 대한 vanadium의 억제는 이 효소의 대표적인 억제제로 알려진 ouabain의 효과에 비해 mole 농도로 비교해 보면 약 100배나 효력이 큰 것으로 나타나 있다. 따라서 vanadium은 신세뇨관 세포에서 Na^+재흡수를 억제함으로써 이뇨작용을 나타낼 것이 기대되고, 흰쥐에서의 실험결과들을 보면 현저한 이뇨작용을 나타냄을 볼 수 있으며 모두 vanadium에 의한 Na-K-ATPase 억제에 기인하는 것으로 설명하였다.

본 실험에서는 토끼에 sodium orthovanadate 0.5 mg/kg/5 min 정맥내 주입시 오히려 요량과 요중 Na^+, K^+, Cl^-배설량이 감소되어 나타났다. 다량의 vanadium은 심장 기능과 호흡의 억제, 신장의 허혈과 무뇨등의 독작용을 일으켜 사망에 이르게 한다고 하나(Roman et al., 1981) Roman 들은 흰쥐에 5 mg/kg 투여로 뚜렷한 이뇨효과를 보았으며 30~50 mg/kg 투여시 독작용에 의해 사망함을 관찰한 것으로 보아, 본 실험에서 사용한 0.5 mg/kg 투여로 인한 항이뇨 효과는 독작용으로 인한 것이 아니고 vanadium에 의한 약리작용으로 생각된다.

Vandium 투여에 의한 요량과 요중 전해질 배설량의 감소가 GFR과 RPF의 감소와 일치하여 일어났으며 Na^+재흡수율은 대조군과 차이가 없으므로 이러한 항이뇨 효과가 신세뇨관 세포에서의 Na^+재흡수 증가때문이라기 보다는 신혈류역학적인 영향에 기인하는 것으로 보여진다. Vanadium에 의한 전신혈압의 변동을 보면 GFR과 RPF의 감소와 함께 상승되어 나타났다.

Vanadium이 심장에 대한 inotropic effect(Akera et al., 1979; Solaro et al., 1980)와 함께 세동맥 평활근의 긴장도를 증가(Jackson, 1912; Inciarte et al., 1980)시키므로 평균 동맥혈압의 증가는 이론적으로 심박출량의 증가 혹은 말초혈관 저항의 증가에 기인한다고 볼 수 있다. 그러나 최근의 연구에서 보면 실제로 vanadium은 마취된 개의 심박출량을 감소시켰으므로 혈압의 상승은 전적으로 말초혈관의 저항 증가 때문이라 할 수 있으며 대부분이 신동맥의 저항 증가때문이라 하였다(Inciarte et al., 1980). 개에서나(Jackson, 1912) 고양이에서(Larsen et al., 1979) vanadium 투여로 신동맥의 저항이 증가되었음을 본 다른 연구도 있다. Vandium 투여 후 신혈류와 사구체 여과율의 감소로 인한 항이뇨 효과에 대한 보고를 개(Inciarte et al., 1980)와 고양이 실험(Larsen et al., 1979)에서 볼 수 있다.

Vanadium에 의한 혈관수축의 생화학적 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 어떤 세포에서는 vanadium이 adenylate cyclase를 자극하여 세포내 cAMP 농도를 증가시킨다 하나 cAMP의 증가는 혈관수축보다는 혈관을 이완시키므로 맞지 않다. 또 다른 vanadium의 작용으로서 세포막의 Ca-ATPase를 억제하여 세포내 Ca^{++}농도를 증가시킴으로써 수축력이 증가될 것이라는 보고(Wierichs et al., 1980)도 있다. 세포내 Ca^{++}농도 증가에 대하여 Ca-ATPase에 대한 vanadium의 직접적인 억제작용 이외에 Na-K-ATPase 억제로 인해 세포막의 양쪽에 Na^+농도 경사가 감소되고 Ca^{++} efflux가 저하됨으로써 세포내 Ca^{++}농도가 증가하게 된다는 간접적인 설명도 있다(Blanstein, 1974). 여러 동물에서 신기능에 대한 vanadium의 효과를 살펴볼 때 흰쥐에서는 이뇨작용이 나타나고, 개 및 고양이와 본 실험에서 사용한 토끼에서는 항이뇨 작용이 일어남을 볼 수 있다. 이러한 차이는 마취나 수술등의 실험 조건으로 인해 신세뇨관 세포에 대한 vanadium의 작용이 나타나지 않게 되었다고 볼 수도 있으나, vanadium 투여로 인해 요량이 감소되었을때 furosemide를 주사하면 요량이 급격히 증가되는 것으로 보아 실험조건의 차이로 인한 것은 아니라고 생각된다.

ouabain은 Na-K-ATPase를 억제하여 신세뇨관에서 전해질의 재흡수를 감소시키나, ouabain이 신동맥 혈관을 수축시켜 사구체 여과율의 감소로 인해 수분과 Na^+의 여과량이 저하되어 신세뇨관에서의 Na-K-ATPase 억제에 의한 효과를 반전시키므로 ouabain이 이뇨제로 사용되지 않음은 잘 알려져 있다(Churchill & McDonald, 1974). 흰쥐에서와는 달리 개, 고양이, 토

끼에서는 vanadium이 ouabain과 유사하게 신세뇨관 세포의 Na-K-ATPase억제로 인한 전해질의 재흡수 저하작용보다는 신동맥의 저항증가로 인한 혈류역학적인 감소효과를 훨씬 크게 나타냄으로써 항이뇨 작용을 보이는 것으로 사료된다.

맺 음 말

동물 조직내에 존재하며 Na-K-ATPase활성을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려진 vanadium이 시험관내에서 토끼 신조직내 Na-K-ATPase활성에 미치는 영향을 ouabain과 비교하고, 토끼에 정맥내 주사하여 신기능과 전신혈압에 미치는 효과를 관찰한 결과는 다음과 같다.

1) Sodium orthovanadate 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M 처치시 Na-K-ATPase활성이 각각 대조군의 73.89, 34.49, 6.50, 4.99%로 현저하게 억제되었다. Ouabain 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}M의 처치시에 Na-K-ATPase의 활성은 각각 대조군의 69.52, 22.84, 3.88%로 억제되어 나타났다.

2) Sodium orthovanadate 0.5 mg/kg/5min 정맥내 주입시 요량, 요중 Na^+, K^+, Cl^-배설량, GFR과 RPF가 60분 경과시까지도 뚜렷이 감소되었으며, 이때 평균 동맥혈압은 유의하게 증가되었다.

참 고 문 헌

Akera, T., Takeda, K., Yamamoto, S. & Brody, T.M.: *Effects of vanadate on Na^+, K^+-ATPase and on the force of contraction in guinea-pig hearts. Life Sci. 25:1803-1812, 1979.*

Balfour W.E., Grantham, J.J. & Glynn, I.M.: *Vandate-stimulated natriuresis. Nature(Lond.) 275:768, 1978.*

Blaustein, M.P.: *The interelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. Rev. Physio. Bilochem. Pharmacol. 70:33-82, 1974.*

Cantley, L,C. Jr., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C. & Guidotti, G.: *Vanadate is a potent(Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J. Biol. Chem. 252:7421-7423, 1977.*

Churchill, P.C. & McDonald, F.D.: *Effect of ouain on renin secretion in anesthetized dogs. J. Physiol.(Lond.) 242:635-646, 1974.*

Glynn, I.M. & Karlish, S.J.D.: *The sodium pump. Annu. Rev. Physiol. 37:13-55, 1975.*

Hatfield, M. & Churchill, P.: *Renal vascular and tubular effects of vanadate in the anesthetized rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 217:406-410, 1981.*

Inciarte, D.J., Steffen, R.P., Dobbins, B.T., Swindall, J.J. & Haddy, F.J.: *Cardiovascular effects of vanadate in the dog. Am. J. Physiol. 239: H47-H56, 1980.*

Jackson, D.E.: *The pharmacological action of vanadium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 3:477-514, 1911-1912.*

Ktaz, A.I. & Epstein, F.H.: *The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. J. Clin. Invest. 46(12):1999-2011, 1967.*

Kaız, A.I. & Epstein, F.H.: *Physiologic role of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biologic membrane. New Engl. J. Med. 278: 253-361, 1968.*

Kumar, A. & Corder, C.N.: *Diuretic and vasoconstrictor effect of sodium orthovanadate on the isolated perfused rat kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213:85-90, 1980.*

Larsen, J.A., Thomsen, O.O. & Hansen, O.: *Vanadate-induced oliguria in the anesthetized cat. Acta Physiol. Scand. 106:495-496, 1979.*

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. & Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.*

Mills, I.H. & Newport, P.A.: *Renal vasoconstriction, hypertension and fall in urinary osmolality produced by arterial vanadate infusion(abstract) J. Physiol.(Lond.) 296:92-93, 1979.*

Nechay, B.R. & Saunders, J.P.: *Inhibition by vanadium of sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase derived from animal and human tissues. J. Environ. Pathol. Toxicol. 2: 247-262, 1978.*

Nieder, G.L., Corder. C.N. & Culp, P.A.: *The effect*

of vanadate on human kidney potassium dependent phosphatase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307:191-197, 1979.

Roman, R.J., Joseph, V.B., Patricio, S. & Claude, I.: *Sodium orthovanadate diuresis in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 218:168-174, 1981.*

Schreiner, G.E.: *Determination of inulin by means of resorcinol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34: 117-120, 1950.*

Skou, J.C.: *Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45:596-617, 1965.*

Smith, H.W., Finkelstein, N., Aliminosa, I., Crawford, B. & Graber, M.: *The clearances of substituted hippuric acids in dogs and man. J. Clin. Invest. 24:288-293, 1945.*

Solaro, R.J., Holroyde, M.J. Wang, T., Matlib, M.A., Grupp, I., Grupp, G. & Schwartz, A.: *Effects of vanadate on biochemical and contractile properties of rabbit hearts. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2:445-452, 1980.*

Underwood, E.J.: *Trace elements in human and animal nutrition(4th ed.)New York: Academic, 1977, p.388-396.*

Wierichs, R., Hagenmeyer, A. & Bader, H.: *Influence of Ca^{++} and Mg^{++} on the vanadate inhibition of the Ca^{++}-ATPase from pig heart sarcoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:1124-1129, 1980.*