

고온, 한냉 및 산도가 토끼 적혈구막 투과성에 미치는 영향

우석대학교 의과대학 생리학교실

李德淑 · 申孝淑 · 黃愛蓮 · 崔德瓊

=Abstract=

Influence of Heating, Cooling and Acidity on the Permeability of the Rabbit Erythrocyte Membrane

D.S. Lee, M.D., H.S. Shin, M.D., E.R. Hwang, M.D. and D.K. Choi, M.D.

Department of Physiology, Woo Sok University, Medical College, Seoul, Korea

Outward movement of hemoglobin and K^+ ion across rabbit erythrocyte membrane after heating, cooling and in acid medium was studied.

One milliliter of rabbit blood was centrifuged and packed red cells were obtained. Packed red cells were resuspended by addition of 4 ml of 0.9% NaCl solution and were subjected to heating ($57^\circ C$ for 5 minutes) or cooling ($-4^\circ C \sim -8^\circ C$ or $-10^\circ C \sim -11^\circ C$ for 10 minutes).

For acid medium experiment packed red cells were resuspended by addition of 4 ml of acid medium of pH 4.5 consisting of 0.01% glacial acetic acid in 0.85% NaCl solution and kept standing for 10 minutes.

All red cell suspensions were centrifuged again and packed red cells were separated. This packed red cells were again suspended in 4 ml of NaCl solution of 0.8%, 0.7%, 0.6%, and 0.5% concentration respectively and kept standing for 20 minutes. The concentration of hemoglobin and K^+ in the supernatant of the above red cell suspensions were measured and the following results were obtained.

1. Outward movement of hemoglobin and K^+ was greatest in red cells subjected to heating. The movement paralleled to the osmolal concentration gradient between extra- and intra-cellular phase of red cells.

2. In acid medium the outflux of hemoglobin and K^+ increased as compared to the control.

3. In red cells subjected to the cold of $-10^\circ C \sim -11^\circ C$ the outflux of hemoglobin and K^+ increased. Whereas in the environment of $-4^\circ C \sim -8^\circ C$ there was no change in the outflux of K^+ . The hemoglobin outflux showed rather a decreased as compared to the control.

서 론

세포 원형질막 투과성에 대하여서는 아직 불명한 점이 많다(Malvin, 1960¹⁾).

구성성분과 삼투질 농도를 달리하는 세포 내외액 사이의 물질이동을 피동적이동과 능동적이동으로 설명하나 세포내외액의 전기화학적 포텐셜 차이로 인하여 물질이동이 일어나는 것은 전자에 속하고 물리화학적으로 설명안되는 물질이동을 능동적이동이라 할 수 있

으며 Na-K pump 작용 같은 것은 그 보기의 하나이다.

적혈구를 등장액이 아닌 용액속에 넣었을 경우에 물 분자의 삼투이동으로 적혈구용적변화함에 의하여 적혈구막이 기계적 변형을 일으켜 혈구막속의 내용물이 유출하거나 또는 반대로 농축되는 일은(최덕경, 1965²⁾) 알려져 있다.

그러나 생체내에서 세포의 체액의 Na^+ 농도가 높고 K^+ 농도가 낮은데 불구하고 Na^+ 은 바깥쪽으로 걸어내고 K^+ 은 안쪽으로 잡아두면서 일정한 전기적 안정성을

유지하고 있음은 물리화학적으로 만든 설명 아니되는 점이다.

1957년 Glynn⁵⁾은 세포막내에 Na⁺, K⁺ 같은 물질과 친화성이 큰 운반체를 생각하고 이것이 특정한 효소작용 아래 항상 Na⁺은 밖으로, K⁺은 안쪽으로 이동 운반한다고 설명하였다.

1942년 Davson^{2,3)}은 능동적 운반과 pH의 관계를, 1955년 Hodgkin 및 Keynes⁶⁾은 온도와외의 관계를 조사하고 능동적 운반에 최저 pH와 최적 온도가 있음을 지적하였다. 또 1960년 Malvin¹¹⁾은 적혈구막 계절성이 고온, 한냉 및 산도의 영향을 많이 받음을 보고하였다.

본 실험은 이상과 같은 관점에서 트끼의 적혈구를 사용하여 세포막 투과성에 좋은 환경이 될 수 없는 고온(57°C)과 한냉(-4°C ~ -8°C, -10°C ~ -11°C) 및 산성(pH 4.5)용액에 두었다가 저장 식염수에 넣었을 때의 혈색소 및 K⁺ 이동을 관찰한 것이다.

실험 방법

트끼 귀의 가장자리 혈관에서 조심스럽게 채혈하고 헤파린으로 응고를 방지하였다. 혈구가 균등하게 섞이게 한 다음 각 1 ml씩 정확하게 시험관에 담고 2,000 회전 20 분동안 원심침전하여 적혈구를 분리하였다.

고온과 한냉에 대한 실험은 상기 각 시험관에다 0.9%의 식염수 4 ml씩을 첨가하여 조심스럽게 섞은후 고온수조(57°C)에는 5 분동안, 한냉수조(-4 ~ -8°C, 또는 -10°C ~ -11°C)에는 10 분동안을 세워 두었다.

산도에 대한 실험은 1 ml 혈액에서 원심분리한 적혈구에다 pH 4.5의 산성용액(0.85% NaCl에 0.01% 초산 첨가한 것) 4 ml를 첨가하여 조심스럽게 섞은후 10 분 동안 두었다. 다음에 각각 원심분리하여 상등액을 제거하였다.

이상과 같이 처리된 적혈구에다 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%의 저장식염수 4 ml씩을 첨가하고 잘 섞은 다음 20 분 동안 가만히 두었다가 원심분리하여 그 상등액에서 용혈도와 K⁺ 농도를 측정하였다.

용혈도의 측정은 Coleman spectrophotometer junior 6 A 파장 555 mμ에서 광학적 밀도를 읽었고 K⁺ 농도는 Coleman의 flame photometer로 측정하였다.

용혈도 및 K⁺ 농도 표시는 다음과 같았다. 즉 용혈도는 0.3% 식염수에서 혈구전체가 용혈을 일으켰을 때의 광학적 밀도를 100%로 잡고 각 실험군의 상등액의 광학적 밀도를 백분률로 표시 하였고 K⁺은 같은 분량의 대조 적혈구 속에 들었던 K⁺ 함유량을 100%로 간주하고 각 저장 식염수내 K⁺ 농도를 백분률로 표시하였다.

실험 성적

트끼 적혈구 용혈도의 실험성적은 제 1 표와 제 1 도에

Table 1. Per cent hemolysis of rabbit erythrocytes in hypotonic NaCl solution after heating, freezing and in acid medium

Exp. group	NaCl sol.	0.7%	0.6%	0.5%
control N=13 (15°C~18°C)		0.40±0.19	0.66±0.36	8.8±8.72.
heating N=11 (57°C)		27.2±7.4	48.0±11.2	78.4±13.7
acid N=9 (pH 4.5)		0.60±0.33	7.2±5.40	89.5±15.3
freezing N=7 (-10°C~-11°C)		2.3±0.64	4.1±2.06	16.9±6.7
freezing N=11 (-4°C~-8°C)		0.22±0.09	0.54±0.32	3.0±3.21

(Mean ± S.D.)

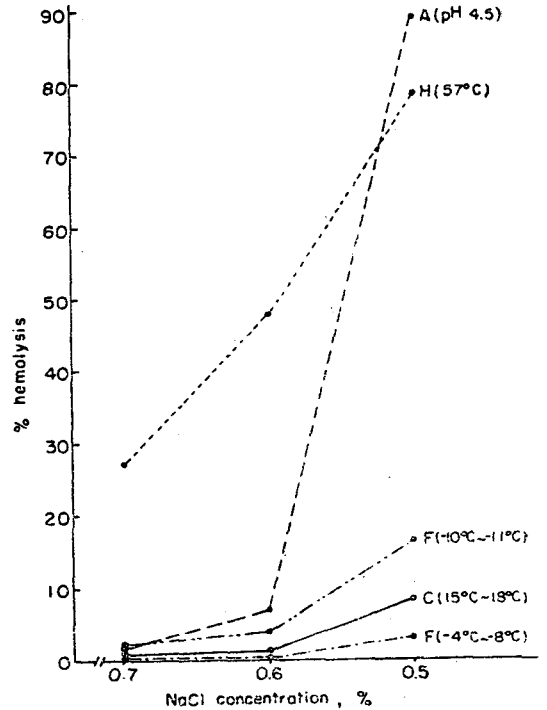


Fig. 1. Per cent hemolysis of rabbit erythrocytes in hypotonic NaCl solution after heating, freezing and in acid medium.

제시한 바와 같이 57°C의 고온에 5분동안 폭로되었던 실험군 11예의 용혈도는 0.7%식염수에서 27.2±7.4% (범위 14.2~35.4), 0.6% 식염수에서 48.0±11.2% (범위 32.1~71.8), 0.5%식염수에서는 78.4±13.7% (범위 71.8~103.4)로서 15°C~18°C의 실온에서 저장 식염수에만 부유시켰던 대조값인 0.7%에서 0.40±0.19% (범위 0.20~0.93), 0.6%에서 0.66±0.36% (범위 0.16~

Table 2. K⁺ Contents of rabbit erythrocytes in hypotonic NaCl solution after heating, freezing and in acid medium

	K ⁺ in original blood (mEq/l)		K ⁺ in hypotonic NaCl sol. (mEq/l)			
	red cell	plasma	0.8%	0.7%	0.6%	0.5%
control N=12 (15°C~18°C)	80.3±8.7	4.2±0.21	0.29±0.03	0.24±0.05	0.25±0.03	1.40±0.66
heating N=11 (57°C)	98.5±2.5	3.5±0.64	0.96±0.22	2.46±0.49	4.14±0.62	6.54±0.45
acidity N=9 (pH 4.5)	86.1±4.07	4.0±0.36	0.30±0.11	0.54±0.44	1.42±1.73	6.21±0.78
freezing N=7 (-10°C~-11°C)	86.4±3.8	4.1±0.35	0.76±0.28	0.40±0.19	0.51±0.15	1.30±0.74
freezing N=11 (-4°C~-8°C)	86.2±5.94	3.9±0.88	0.36±0.15	0.32±0.19	0.52±0.36	1.87±0.84

Mean±S.D.

1.44), 0.5%에서 8.8±8.72%(범위 0.75~28.9)의 용혈도 보다 모두 유의한 증가를 보였다(P<.001). 이것은 1960년에 Malvin이 먼저 고온 환경에 두었다가 저장액에 혈구를 부유시켰을 경우 혈구막의 깨질성이 가장 높았다는 결과와 비슷하다.

pH 4.5의 산성액에 넣었던 실험군 9예에서는 0.7% 용액에서 0.60±0.33%(범위 0.12~1.22), 0.6% 용액에서 7.2±5.4%(범위 3.2~14.4), 0.5% 용액에서 89.5±15.3%(범위 68.4~112.1)로서 고온군 보다는 낮으나 0.5% 식염수에서 유의한 증가를 보였다. 한냉군에서는 저 한냉군과(-4°C~-8°C) 고한냉군(-10°C~-11°C)은 그 태도가 약간 다르고 -4°C~-8°C군 11예에서는 오히려 대조군 보다 낮은 용혈도를 보였는 바 0.7% 용액에서 0.22±0.09%(범위 0.14~0.41), 0.6%에서 0.54±0.32%(범위 0.18~1.1), 0.5%에서 3.0±3.21%(범위 0.77~8.1)을 보였다. 그러나 -10°C~-11°C 한냉군 7예에서는 0.7% 용액에서 2.3±0.64%(범위 1.49~2.9), 0.6% 용액에서 4.1±2.06%(범위 1.5~6.7), 0.5% 용액에서 16.9±6.7%(범위 9.3~24.3)로 대조군 보다는 약간 높은 용혈도를 나타냈다. 이것을 그림으로 표시한 것이 제 1도이다.

K⁺의 적혈구막으로부터 유출한 농도를 제 2표에 제시하고 실험전 혈구내 함유량에 대하여 유출된 K⁺의 백분율 표시를 제 3표와 제 2도에 제시한다.

정상 토끼 적혈구내의 K⁺농도는 80.3에서 98.5 mEq/l 사이에 있었고 혈장내 농도는 3.5에서 4.1 mEq/l 사이에 있었는데 각 저장 식염수 환경에서 유출된 K⁺은 대략 용혈도의 경우와 같은 경향으로 고온군에서 가장 높은 유출량을 나타냈다. 즉 0.8% 용액에서 0.96±0.22 mEq/l (범위 0.65~1.30), 0.7% 용액에서 2.46±

0.49 mEq/l (범위 1.35~2.9), 0.6%에서 4.14±0.62 mEq/l (범위 2.5~5.1), 0.5% 용액에서 6.54±0.45 mEq/l (범위 5.8~7.1)로 대조군의 0.8% 용액에서 0.29±0.03 mEq/l (범위 0.18~0.29), 0.7%에서 0.24±0.05 mEq/l (범위 0.18~0.31), 0.6%에서 0.25±0.03 mEq/l (범위 0.20~0.30), 0.5%에서 1.40±0.66 mEq/l (범위 0.43~2.4)보다 유의하게 증가하였다. 산도군 9예에서는 0.8% 용액에서 0.30±0.11 mEq/l (범위 0.15~0.55), 0.7%에서 0.54±0.44 mEq/l (범위 0.17~1.40), 0.6%에서 1.42±1.73 mEq/l (범위 0.51~1.65), 0.5%에서 6.21±0.78 mEq/l (범위 5.5~7.1)로서 고온군 보다는 낮으나 대조군보다 높은 유출도를 나타냈고 특히 0.5% 용액에서는 월등히 높은 값을 보였다.

한냉군에서는 대조군보다 약간 높은 유출도를 보였으나 별로 큰 의의는 없었고 -10°C~-11°C 사이의 7예에서는 0.8%에서 0.76±0.28 mEq/l (범위 0.4~1.2), 0.7%에서 0.40±0.19 mEq/l (범위 0.25~0.75), 0.6%에서 0.51±0.15 mEq/l (범위 0.31~0.65), 0.5%에서 1.30±0.74 mEq/l (범위 0.60~2.2)이었다. 저한냉군 보다는 약간 높은 유출도였다.

-4°C~-8°C인 저한냉군 11예에서는 0.8% 용액에서 0.36±0.15 mEq/l (범위 0.20~0.70), 0.7% 용액에서 0.32±0.19 mEq/l (범위 0.18~0.75), 0.6% 용액에서 0.52±0.36 mEq/l (범위 0.20~1.25), 0.5% 용액에서 1.87±0.84 mEq/l (범위 0.48~5.05)로서 대조군보다 약간 높기는 하지만 통계학적으로 유의한 것은 아니었다.

이상과 같은 유출량을 대조 적혈구내 K⁺ 함유량에 대한 백분율로 표시한 것이 제 3표이다.

즉 대조군 12예에서는 0.8% 용액에서 0.28±0.04%

Table 3: Per cent less of K⁺ of rabbit erythrocytes in hypotonic NaCl solution after heating, freezing and in acid medium

NaCl sol.	0.8%	0.7%	0.6%	0.5%
Exp. group				
Control N=12 (15°C~18°C)	0.28±0.04	0.30±0.07	0.32±0.06	1.31±0.75
heating N=11 (57°C)	1.00±0.10	2.61±0.33	4.38±0.42	6.61±0.51
acidity N=9 (pH 4.5)	0.34±0.10	0.74±0.71	1.66±1.77	7.49±1.87
freezing N=7 (-10°C~-11°C)	0.85±0.34	0.45±0.22	0.62±0.11	1.21±0.18
freezing N=11 (-4°C~-8°C)	0.42±0.18	0.37±0.20	0.61±0.42	2.17±1.41

Mean ±S.D.

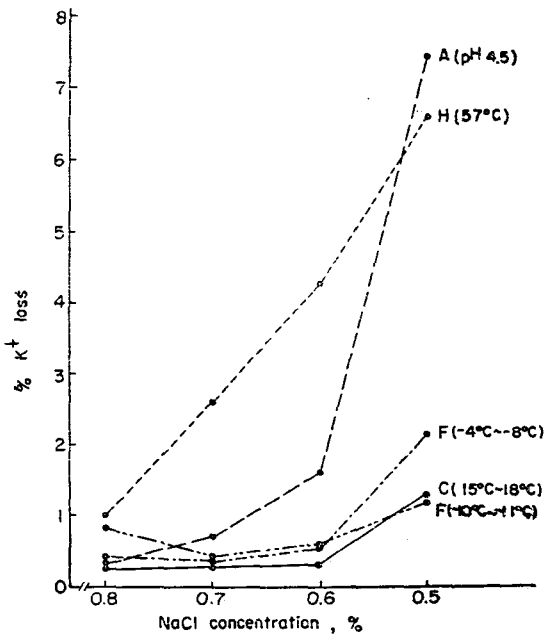


Fig. 2. Per cent loss K⁺ of rabbit erythrocytes in hypotonic NaCl solution after heating, freezing and in acid medium.

(범위 0.2~0.33), 0.7%용액에서 0.30±0.07%(범위 0.21~0.47), 0.6%용액에서 0.32±0.06%(범위 0.24~0.44), 0.5%용액에서 1.31±0.75%(범위 0.52~2.67)이라는 낮은 값이었다. 그러나 실험군에서는 고온군에서 월등히 K⁺유출도가 높은 바 0.8%용액에서 1.00±0.10%(범위 0.71~1.33), 0.7%용액에서 2.61±0.33%(범위 1.88~2.96), 0.6%용액에서 4.38±0.42%(범위 4.0~5.48), 0.5% 용액에서 6.61±0.51%(범위 5.69~7.19)라는 모두 유의한 증가이었다(p<0.01).

산성용액에서는 0.8%용액에서 0.34±0.10%(범위 0.

24~0.59), 0.7%용액에서 0.74±0.71%(범위 0.17~2.33), 0.6%용액에서 1.66±1.77%(범위 5.00~10.63)로 고온군 다음가는 유출도였다. 특히 0.5%식염수에서는 같은 농도의 고온군 보다 월등히 증가하고 있었다. 이러한 결과는 용혈도에서도 마찬가지로 0.5%식염수에서 고온군보다 용혈도도 월등히 증가하고 있었다. 한냉군 -10°C~-11°C 7 에에서의 결과를 보면 0.8%용액에서 0.85±0.34%(범위 0.43~1.40), 0.7%용액에서 0.45±0.22%(범위 0.27~0.88), 0.6%용액에서 0.62±0.11%(범위 0.43~0.70), 0.5%용액에서 1.21±0.18%(범위 0.70~2.33)로서 대조군보다 약간 높은 경향이나 유의한 것은 아니었고 더욱 -4°C~-8°C의 저한냉군 11 에에서는 0.8%용액에서 0.42±0.18%(범위 0.25~0.90), 0.7%용액에서 0.37±0.20%(범위 0.21~0.91), 0.6%용액에서 0.61±0.42%(범위 0.23~1.52), 0.5%용액에서 2.17±1.41%(범위 0.56~6.01)로서 대조군보다 약간 높은 경향을 보일 뿐이었다.

II. 활

적혈구막을 사이에 두고 일어나는 물질이동은 삼투질 농도차에 의하여 여러가지 반응 속도와 내용물 이동 정도에 차이가 있으며⁴⁾ 주위환경 용액의 구성에 따라서도 차이가 있음을 잘 아는 사실이다.^{1,7,9)}

그러나 세포막의 기계적 변화가 아닌 K-Na pump 작용 같은 것이 온도와 pH에 의하여 어떠한 영향을 받는가는 흥미있는 것이라 생각된다.

본 실험의 결과를 총괄하여 보면 용혈도나 K⁺ 유출도가 고온군에서 현저히 증가하고 있으며 다음이 산성 용액 부유군이었고 고한냉군(-10°C~-11°C)에서는 증가의 경향을 보였다.

저한냉군(-4°C~-7°C)에서는 대조군과 별 차이가

없을 뿐 아니라 용혈도에서는 오히려 대조군 보다도 낮은 값을 보이고 있다.

따라서 고온과 낮은 pH는 적혈구막 투과성에 어떠한 영향을 주는 것으로 생각된다.

두번째 부유시킨 식염수의 삼투질 농도의 차가 클수록 용혈도 및 K⁺유출의 정도도 더욱 증가하고 있다. 이것은 고온과 산성용액에 의한 손상이 삼투적 손상과 겹쳐져 이중의 효과로 나타났다고 생각된다.

산성군의 0.5%식염수에서의 용혈도 및 K⁺유출도는 고온군 보다 더 높은 바 정확한 설명을 할 수는 없으나 적혈구막 구조에 어떠한 영향을 주는 것이 아닐까 생각한다.

1960년 Malvin¹¹⁾은 사람의 적혈구에서 57°C 고온과 0.5%와 0.45% 사이의 식염수에서 용혈도에 관한 실험을 하고 두 가지를 동시에 처리한 것이 저삼투용액에 먼저 처리하고 다음에 고온에 처리한 것들보다 월등히 용혈도가 증가하여 있음을 보고한 바 있다.

1932년 이래 Davson^{1,2,3)} K, Na 이온이 온도와 pH에서 받는 영향을 연구하고 고양이에서는 온도 35°C ~ 40°C가 전해질의 Catalyzed enzyme의 최적 온도라고 말하고 pH 7.2~7.6 사이의 용액속에서 효소 운반 작용이 가장 활발한 것을 관찰하고 세포막의 능동적 투과성에 최적 pH가 있음을 지적하였다.

崔⁴⁾는 반복된 삼투손상에서 적혈구막이 삼투적 농도 차가 크면 클수록 손상의 정도가 크고 S자형 곡선을 나타냈음을 발표한 바 있다.

본 실험에서 고온 및 산성용액 환경이 삼투적 손상과 겹쳤을때 결과는 대략 그들의 결과와 일치하는 것으로 생각된다.

한냉에 대한 결과를 보면 고한냉군(-10°C ~ -11°C)에서 약간의 영향을 받은것 같으나 통계학적 의의는 없고 더욱 저한냉군(-4°C ~ -8°C)에서는 용혈도가 대조군 보다 감소되고 있음은 세포막 구조의 수축이 원인이 되어 있음이 아닐까 생각된다.

이상으로 보아 고온 환경이 적혈구막 투과성에 미치는 영향이 지대함을 짐작할 수 있다.

결 론

정상 토끼의 적혈구를 사용하여 57°C의 고온, pH 4.5의 산성용액, -4°C에서 -8°C 및 -10°C ~ -11°C의 한냉 환경이 적혈구막 투과성에 미치는 영향을 관찰하였다.

같은 분량의 적혈구를 대조군(13예)과 실험군에 사용하였고 고온군(11예)에서는 57°C로 유지하는 수조속에 5분간을, 산성용액군(9예)은 0.85%식염수에 0.01%의 glacial acetic acid를 첨가한 pH 4.5의 용액에 20분간

을, 한냉군에서는 -4°C ~ -8°C (11예)와, -10°C ~ -11°C(7예)를 유지하는 수조속에 10분동안을 두었다. 다음에 상등액을 제거하고 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%의 저장 식염수에 부유시키고 헤모글로빈 및 K⁺유출도를 관찰한 결과는 다음과 같았다.

1) 고온군에서 가장 높은 헤모글로빈 및 K⁺ 유출도를 보였고 두번째 부유시킨 식염수에서 삼투질 농도차가 클수록 용혈도 및 K⁺유출도가 상승하였다.

2) 산성용액군에서는 용혈도 및 K⁺유출도 다같이 유의한 증가를 보였다.

3) -10°C ~ -11°C의 고한냉군에서는 양자 다같이 유출도가 증가하는 경향이였다.

4) -4°C ~ -8°C의 한냉군에서는 변화가 없었고 특히 헤모글로빈 유출도는 오히려 대조군 보다 낮은 경향이였다.

이상으로 보아 고온이 적혈구막 투과성 및 구조에 어떠한 영향을 주는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Davson, H.: *Loss of K⁺ from the erythrocyte in hypotonic saline. J. Cellular and Comp. Physiol., 10:247, 1937.*
- 2) Davson, H. and Danielli, J.F.: *Factors in cation permeability. Biochem. J., 32:996, 1938.*
- 3) Davson, H. and Reiner, J.M.: *Ionic permeability: an enzymelike factor concerned in the migration of sodium through the cat erythrocyte membrane. J. Cell. Comp. Physiol., 20:325, 1942.*
- 4) 崔德瓊: 반복된 삼투이동에 의한 적혈구 껍질성의 변화. 수도의대 잡지, Vol. 2, No. 2, 85-88, 1965.
- 5) Glynn: *Hypothetical scheme of Na⁺ K⁺ exchange pump. Progr. Biophysics, 8:241-307, 1957.*
- 6) Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D.: *The potassium permeability of a giant nerve fibre. J. Physiol., 128:61-88, 1955.*
- 7) Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D.: *The potassium permeability of a giant nerve fibre. J. Physiol., 128:28-60, 1955.*
- 8) Hunter, F.T.: *Aphotoelectric method for the quantitative determination of the erythrocyte fragility. J. Clin. Invest., 19:691, 1940.*
- 9) Hunter, F.R.: *The effect of tannic acid on the permeability of erythrocytes to none electrolytes. J. Cellular and Comp. Physiol., 55:175, 1960.*
- 10) Jacobs, M.H. & Parpart, A.K.: *Rate of haemo-*

lysis in hypotonic solutions of erythrocytes. Biol. Bull., 63:224, 1932.

- 11) Malvin, M. Ketchel: *Interaction between certain traumas causing the lysis of red cells. J. Appl.*

Physiol., 15:608, 1960.

- 12) Ponder, E.: *The prolytic loss of potassium from human red cells. J. Gen. Physiol., 30:479, 1947.*