

# Ethanol 이 고양이 신장 Na-K-ATPase 활성에 미치는 영향

김 주 현

경상대학교, 농과대학

김 용 근

부산대학교 의과대학 생리학교실

## 서 론

살아있는 세포에서는 세포막에 존재하는 Na-pump의 작용으로 K<sup>+</sup>은 세포막 안으로, Na<sup>+</sup>은 세포막 밖을 향하여 능동적으로 이동되고 있기 때문에 세포막을 경계로 세포외부는 Na<sup>+</sup>의 농도가 높은 수준을 유지하고 있다.<sup>2)</sup> 이와같이 Na<sup>+</sup>의 세포막을 통한 이동으로 인하여 신경 세포의 흥분이 전달되어지고 근육이 수축되는 등<sup>15)</sup> 여러가지 생리적 기능이 수행되고 있을 뿐만아니라, 세포의 용적이 정상크기로 유지되어지고<sup>12)</sup> 체액의 Na<sup>+</sup>의 농도가 일정한 수준으로 조절되고 있다.<sup>4)</sup>

세포막을 통한 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 이동에는 배사에너지를 필요로 하는데 이 현상에서는 adenosine triphosphate (ATP)가 그 에너지원으로 사용 되어지고 있음은 널리 알려진 사실이다.<sup>3,8,9,24,29)</sup>

즉 적혈구에서 ATP와 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 이동사이에는 밀접한 관계가 있음이 일찍이 보고되어졌으며<sup>12,20,29)</sup>, Skou<sup>25)</sup>는 개의 말초신경 세포에서 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>에 의해 활성화되는 adenosine triphosphatase (ATPase) 즉 Na-K-ATPase가 존재한다고 보고하였으며, 이 효소제가 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 능동적 이동에 관여한다고 주장하였다.

그 이후 Post 등<sup>20)</sup>과 Duham 및 Glynn<sup>6)</sup>도 이 효소제가 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 능동적 이동에 관여하고 있음을 입증하였다.

Na-K-ATPase의 특징을 보이는 효소제가 여러 조직<sup>5,15,17,26,30)</sup>에서 발견되어 졌으며, Bonting 등<sup>5)</sup>은 동물의 몇개의 특수 조직을 제외한 대부분의 조직에 Na-K-ATPase가 존재하고 있음을 밝혔다. 하지만 Na-K-ATPase가 Na<sup>+</sup>의 능동적 이동에 직접적으로 관여하는지는 아직까지 명확히 규명되지도 않았지만 신세노관에서의 Na<sup>+</sup>의 능동적 이동에 Na-K-ATPase가 관여하고 있음은 Na-K-ATPase에 대한 선택적 억제제인 ouabain에 대한 Na<sup>+</sup>의 재흡수 감소와 Na-K-ATPase 활성도가 감소된다는 보고<sup>13,19,28)</sup>와 신세노관에서의 Na<sup>+</sup>의 재흡수와 Na-K-ATPase 활성도는 직선적인 비례관계를 가지고

있음과 더불어 신장내 효소활성의 분포상태와 Na<sup>+</sup>의 재흡수에 관계된 영역이 일치된다는 보고 등<sup>18)</sup>으로 보아 관계가 있음을 알 수 있다.

ethanol은 여러 조직에서 아미노산<sup>21)</sup> 및 thiamine<sup>14)</sup>의 능동적 이동을 억제하는 것으로 알려져 있으며 이들 물질이 능동적으로 이동되어질 때에 Na<sup>+</sup>을 필요로 하고 있기에 ethanol이 이들 물질의 능동적 이동을 억제하는 기전 중에 Na<sup>+</sup>의 능동적 이동에 관여하고 있는 Na-K-ATPase를 억제함으로써 억제현상을 일으킬 수 있을 가능성이 매우 높다.

그래서 본 저자들은 ethanol이 고양이 신장 homogenate에서 Na-K-ATPase 활성화에 어떤 영향을 미치는지 효소역학적 분석을 통하여 그 억제기전을 밝히기 위하여 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 본 실험에 사용한 동물은 체중 2~3kg의 건강하다고 인정되는 고양이를 암수 구별없이 사용하였다.

**신피질 homogenate 준비** : 고양이 두부를 타격하여 실신시킨 후 신장을 제거하고 신피질과 외부수질 부분만을 분리시킨 다음 0.25M sucrose, 40mM tris-HCl, 5mM EDTA 및 2.4mM deoxychloride (pH 6.8)가 함유된 용액으로 조직 1g당 20ml의 비율(W/V)로 넣고, 4°C에서 homogenate를 만들었으며, 이중으로 된 가아제로 homogenate를 걸러서 0°C냉장고에 넣어 보관시켰다. 사용하기 전에 준비된 homogenate 용액을 다시 10배로 희석하여 사용하였다.

homogenate 내 단백질 함량은 표준용액으로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등의 방법<sup>16)</sup>으로 측정하였다.

**Na-K-ATPase 활성도 측정** : ATPase 활성도 측정에는 incubation용액내 ATP를 가하고 ATPase에 의해 가수분해 되어 유리되어지는 무기인산을 측정하여 이를

ATPase 활성도로 하였다.

총 ATPase (Mg-ATPase+Na-K-ATPase) 활성도를 측정하기 위하여 incubation 용액의 기본조성은 2mM ATP, 3mM Mg<sup>++</sup>, 100mM Na<sup>+</sup>, 10mM K<sup>+</sup> 및 100mM tris-HCl (pH7.5, at 37°C)로 하였고 여기에 적당한 양의 효소단백질을 첨가하여 전체량이 1ml가 되게 하여 실험을 실시하였다.

한편 상기 조성중 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>이 없는 상태에서 0.1mM ouabain이 존재할 시에 ATPase를 측정하여 Mg-ATPase 활성도로 하였으며, 총 ATPase와 Mg-ATPase의 활성도 차이를 Na-K-ATPase 활성도로 하였다.

ATP가 없는 incubation 용액을 37°C에서 10분 동안 preincubation 한 후 여기에 ATP를 첨가하여 반응을 시작하였으며, ethanol은 preincubation 용액에 첨가하였다. 그리고 10분동안 incubation한후 병한 11.67% HClO<sub>4</sub>를 0.4ml 첨가하여 반응을 정지시켰으며 ATP가 가수분해되어 유리되어지는 무기인산의 농도는 Fiske 및 Subbarow의 방법<sup>7)</sup>으로 측정하였으며, 효소역학적 분석에서 효소활성도를  $\mu\text{mol}/\text{pi}/\text{mg. protein}/10\text{min}$ 로 나타내었다.

## 결 과

### 1. Na-K-ATPase 활성에 대한 ethanol의 효과:

Na-K-ATPase 활성은 ethanol의 농도 1.0에서 15.0% 범위내에서 농도에 비례하여 억제되어졌으며, 50%억제 농도는 7.5% ethanol에서 나타났다(그림 1).

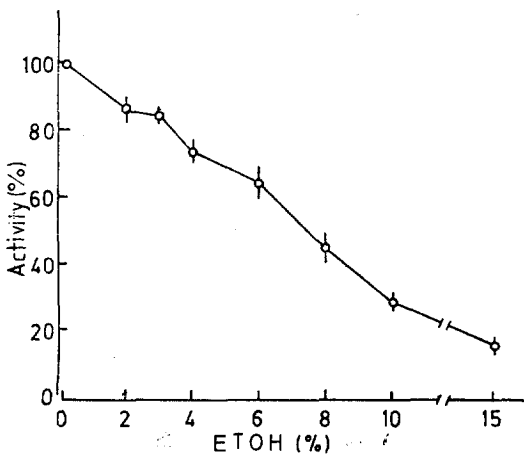


Fig. 1. Ethanol inhibition curve of Na-K-ATPase activity. Standard incubation conditions were used. Each point represents per cent inhibition (mean±SE) of four experiments.

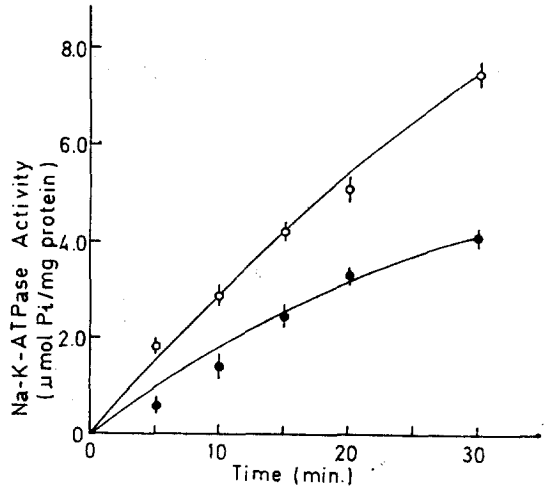


Fig. 2. Effect of incubation time on Na-K-ATPase activity. 0, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean±SE of four experiments.

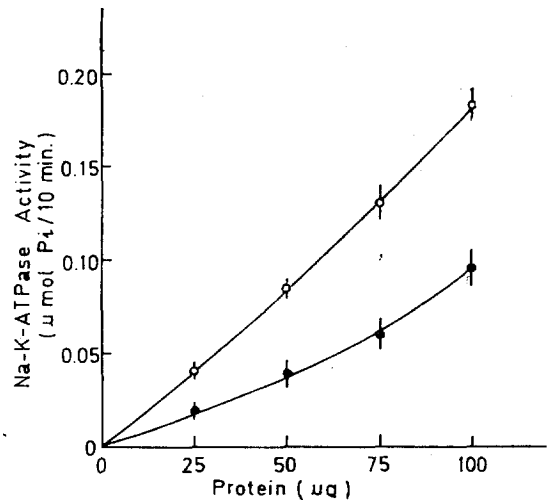
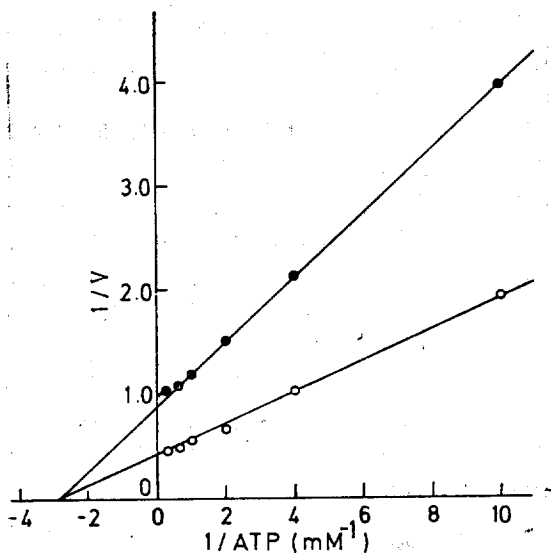
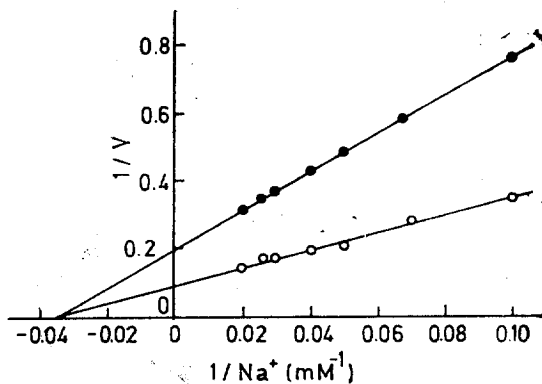


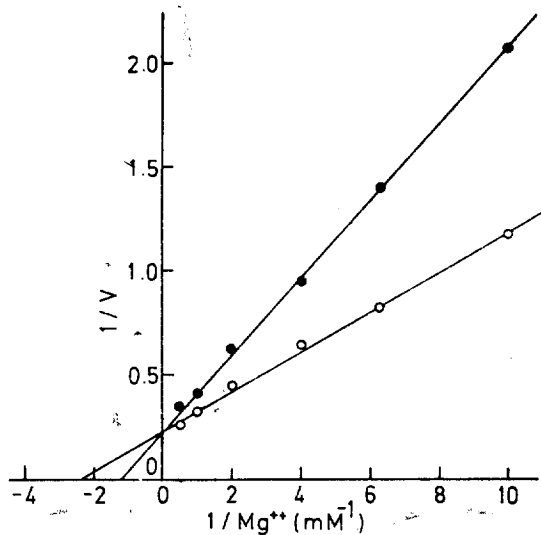
Fig. 3. Rate of ATP hydrolysis as a function of enzyme concentration. Standard incubation conditions were used. 0, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean±SE of four experiments.



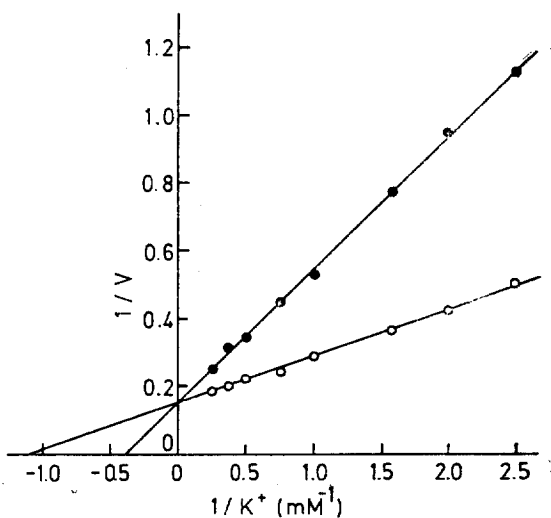
**Fig. 4.** Effect of ethanol on ATP activation kinetics of Na-K-ATPase activity. ATP concentration was varied from 0.1 to 3.0mM while maintaining optimal concentration of Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. ●, control; ○, 8% ethanol. Each point represents mean of four experiments.



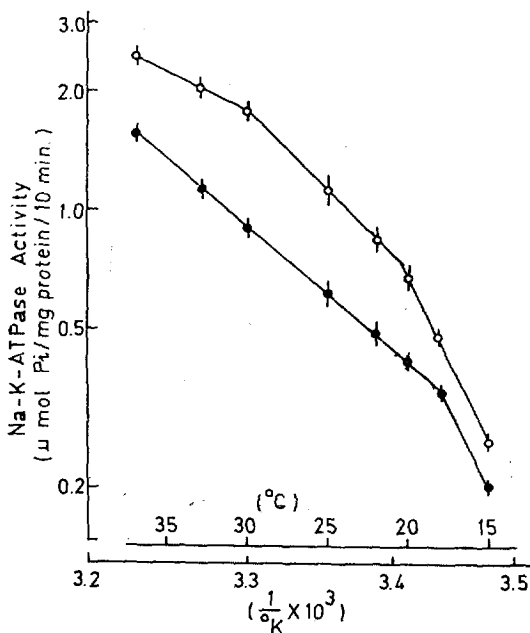
**Fig. 6.** Effect of ethanol on Na<sup>+</sup> activation of Na-K-ATPase activity. Na<sup>+</sup> concentration was varied from 10 to 50mM while maintaining K<sup>+</sup> concentration constant at 10mM. ○, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean of four experiments.



**Fig. 5.** Effect of ethanol on Mg<sup>++</sup> activation of Na-K-ATPase activity. Mg<sup>++</sup> concentration was varied from 0.1 to 2.0 mM while standard conditions were used. ○, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean of four experiments.



**Fig. 7.** Effect of ethanol on K<sup>+</sup> activation of Na-K-ATPase activity. K<sup>+</sup> concentration was varied from 0.4 to 4.0 mM while maintaining Na<sup>+</sup> concentration constant at 50mM. ○, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean of four experiments.



**Fig. 8.** Arrhenius plot of Na-K-ATPase activity. Na-K-ATPase activity was determined at various temperature. ○, control; ●, 8% ethanol. Each point represents mean  $\pm$  SE of four experiments.

**2. preincubation 시간에 따른 ethanol의 효과:**

Na-K-ATPase 활성에 대한 ethanol의 효과가 preincubation 시간에 따라서 어떤 변화가 나타나는지를 관찰하기 위하여 8% ethanol과 15% ethanol의 존재하에서 5, 10, 15, 20, 및 30분 preincubation한 후에 효소활성을 측정하였던 바 표 1과 같았다.

표 1에서 보는 바와 같이 8%일 때는 ethanol에 의한 억제정도가 preincubation 시간에 따라 차이가 없었으나, 15%일 때는 시간이 길어짐에 따라 억제정도가 증가하는 경향을 보였다.

**3. incubation 시간에 따른 ethanol의 효과:** 교양이 신피질에서 Na-K-ATPase 활성에 대한 ethanol의 효과가 incubation 시간에 따라서 어떤 영향을 받는지를 관찰하기 위하여 incubation 5, 10, 15, 20, 및 30분에서 Na-K-ATPase 활성을 관찰하였던 바 그림 2와 같았다.

incubation 30분까지 시간이 증가함에 따라 Na-K-ATPase 활성도가 증가하는 양상을 보이고 있으며, 또한 활성에 대한 ethanol의 효과는 incubation 시간의 증가에 따라 ethanol의 존재하에서 같은 양상으로 억제되어지므로 ethanol의 효과가 incubation 시간에 따라 영향을 받지 않는 것을 알 수 있다.

**4. 효소 농도에 따른 ethanol의 효과:** 그림 3은 효소농도에 따른 ethanol의 효과를 관찰한 결과이다.

ATP가 가수분해되는 정도는 효소농도 증가에 따라 직선적으로 기울어지는 곡선을 나타내었다.

8% ethanol이 존재하거나, ethanol이 존재치 않는 대조군이나 모두 효소 활성의 곡선을 연장한 결과가 0 점에서 만남으로써 ethanol에 의한 Na-K-ATPase 활성의 억제 현상은 가역적인 반응임을 관찰할 수 있다.

**5. ATP농도 변화에 따른 ethanol의 효과:** incubation 용액내 다른 조건은 일정하게 유지하고 ATP 농도를 0.1에서 3.0mM까지 ATPase 활성에 미치는 효과를 관찰한 결과를 그림 4와 같이 Lineweaver-Burk plot 하였다.

대조군에 비해 8% ethanol 존재하에 있어서 apparent max가 5.0에서 1.1  $\mu$ mol pi/mg protein/10min로 감소하였으나 apparent km 값에는 변화를 보이지 않으므로

**Table 1.** Effect of Preincubation Time on Inhibition of Na-K-ATPase Activity by Ethanol

(mean  $\pm$  SE)

Preincubation time (min.)	Control ( $\mu$ mol Pi/mg protein/10 min)	8% Ethanol		15% Ethanol	
		Specific activity ( $\mu$ mol Pi/mg protein/10 min)	% of control	Specific activity ( $\mu$ mol Pi/mg protein/10 min)	% of control
5	4.46 $\pm$ 0.42	2.07 $\pm$ 0.33	46.41 $\pm$ 3.14	0.44 $\pm$ 0.10	15.28 $\pm$ 2.12
10	4.70 $\pm$ 0.27	2.20 $\pm$ 0.12	46.80 $\pm$ 4.03	0.62 $\pm$ 0.02	14.21 $\pm$ 1.98
15	4.79 $\pm$ 0.05	2.25 $\pm$ 0.07	46.97 $\pm$ 3.84	0.73 $\pm$ 0.05	15.24 $\pm$ 1.02
20	4.18 $\pm$ 0.22	2.08 $\pm$ 0.27	47.98 $\pm$ 4.18	0.78 $\pm$ 0.12	10.98 $\pm$ 3.02
30	4.70 $\pm$ 0.50	2.10 $\pm$ 0.08	44.68 $\pm$ 3.20	0.53 $\pm$ 0.09	9.27 $\pm$ 2.01

써 전형적인 non-competitive inhibition 양상을 보이고 있다.

**6. Mg<sup>++</sup>농도 변화에 따른 ethanol 효과** : Incubation 용액내 ATP 농도를 0.1에서 2.0mM까지 변화 시켜서 Mg<sup>++</sup>에 의한 Na-K-ATPase 활성화에 ethanol이 어떤 영향을 미치는지를 관찰하여 그림 5와 같이 Lineweaver-Burk plot 하였다.

대조군과 8% ethanol 존재하에 있어서나 모두 apparent max은 4.17 $\mu$ mol pi/mg protein/10min로 변화가 없었으나, apparent km치가 ethanol 존재시에 대조군에 비해 0.42에서 0.83mM로 증가되어짐이 관찰되었음으로 전형적인 competitive inhibition 양상을 보이고 있음을 관찰할 수가 있다.

**7. Na<sup>+</sup> 농도에 따른 ethanol의 효과** : incubation 용액내 K<sup>+</sup>농도를 10mM로 일정하게 유지시키고 Na<sup>+</sup>농도를 10에서 50mM로 변화시켜서 Na<sup>+</sup>에 의한 Na-K-ATPase 활성화에 ethanol이 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하여 그림 6과 같이 Lineweaver-Burk plot 하였다.

대조군과 8% ethanol 존재하에 있어서나, apparent km 치는 28.57mM로서 변화가 없었으나 apparent max가 8% ethanol 존재시에 5.01에서 1.11  $\mu$  mol pi/mg protein/10min로 감소되어진 것으로 보아 전형적인 non-competitive inhibition 양상을 보이고 있음을 알 수 있다.

**8. K<sup>+</sup> 농도 변화에 따른 ethanol의 효과** : incubation 용액내 Na<sup>+</sup>의 농도를 50mM로 일정하게 유지하고 K<sup>+</sup>의 농도를 0.4mM에서 4.0mM까지 변화시켜서 K<sup>+</sup>에 의한 Na-K-ATPase 활성화에 ethanol이 어떤 영향을 미치는지를 관찰하여 그림 7과 같이 Lineweaver-Burk plot 하였다.

대조군과 8% ethanol 존재하에서 모두 apparent Vmax은 0.67 $\mu$ mol pi/mg protein/10min로 변화가 없었지만 apparent km치가 8% ethanol 존재시에 0.91에서 2.67mM로 증가되어 짐으로써 전형적인 competitive inhibition 양상을 보이고 있다.

**9. 온도 변화에 따른 ethanol의 효과** : 그림 8은 incubation 온도를 17°, 20°, 25°, 30°, 및 37°C에서 8% ethanol 존재시와 대조군에서의 Na-K-ATPase 활성화에 대한 영향을 관찰하여 그 결과 Arrhenius plot한 것이다.

ethanol이 존재치 않는 대조군에서는 apparent break point가 21°와 30°C 두곳에서 나타났으나 ethanol 존재시에는 30°C에서의 회절이 없어지면서 ethanol이 존재치 않을때 나타났던 21°C의 회절이 18°C로 이동되어졌다.

## 고 찰

ethanol이 아미노산<sup>21)</sup> 및 thiamine<sup>14)</sup>과 같은 필수 영양소의 능동적 이동을 억제한다는 것은 널리 알려져 있지만, ethanol이 물질이동에 영향을 미칠 때 어떤 방법으로 작용하는 지는 완전히 밝혀져 있지 않다.

Hoyumpa 및 Nichols<sup>14)</sup>는 쥐의 소장에서 thiamine의 이동에 대한 실험에서 ethanol이 ouabain과 같은 방법으로 Na-K-ATPase 활성을 억제하고 있음을 관찰하고, ethanol이 Na-K-ATPase 활성을 억제함으로써 thiamine의 능동적 이동을 억제할 것이라고 추측하였으며 또한 Henderson 등<sup>11)</sup>도 ethanol의 효소가 태반 세포막에서 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 농도차를 유지시키는 ATPase 효소제를 방해한다는 것을 보고하였다.

이와같이 ethanol의 Na-K-ATPase 활성 억제작용이 나아가서는 여러가지 물질의 능동적 이동에 영향을 미칠 수 있게 되었다.

본 실험에서도 역시 ethanol이 고양이 신장 Na-K-ATPase 활성을 강력하게 억제하고 있음을 관찰할 수 있었으며, Na-K-ATPase 활성을 50% 억제하는 농도는 김<sup>32)</sup>이 보고한 신피질 절편에서의 PAH 이동을 50% 억제하는 ethanol의 농도와 유사한 7.5%로 나타났다.

preincubation 시간에 따라 Na-K-ATPase 활성이 8% ethanol이 존재시에는 억제 정도에 차이를 보이지 않고, 15% ethanol 존재시에는 preincubation 시간의 증가에 따라 억제 정도가 증가되어진 것은 ethanol의 높은 농도에서는 Na-K-ATPase가 효소로써 활성을 나타내기 위한 phospholipid가 제거되어짐<sup>23)</sup>으로써 나타난 것으로 추측되어 진다.

incubation 시간에 따른 실험에서는 일정한 농도의 ATP가 분해될 때 까지는 시간이 증가되어짐에 따라서 Na-K-ATPase 활성이 직선적인 증가를 보이고 있으며, 그 이후의 incubation 시간에서는 곡선적으로 기울어지고 있음을 보이고 있는데, 이와같은 양상은 이 곡선적인 증가 양상을 보이는 수준에서 Na-K-ATPase에 의해 ATP의 가수분해에 의해 생긴 ADP에 의한 ATPase 효소제의 product inhibition이거나 negative feedback을 암시하고 있다.<sup>1)</sup>

효소 농도에 따른 ethanol의 Na-K-ATPase 활성화에 대한 억제작용에 대하여 김<sup>32)</sup>이 보고한 고양이 신피질 절편에서 PAH이동에 대한 ethanol의 영향에서 가역적인 반응을 보인다고 보고<sup>32)</sup>한 것과 유사하게 ethanol의 Na-K-ATPase 활성화에 대한 억제도 가역적인 반응을 보이고 있다.

ethanol이 어떤 기전에 의해 Na-K-ATPase 활성을

억제하는 지 본 실험의 효소역학적 분석을 통하여 규명한 결과  $Mg^{++}$ 과  $K^+$ 에 의하여 효소활성이 competitive inhibition 양상을 나타내고 있기에, ethanol이 효소의 반응과정 중 즉 Whiltan 및 Wheeler<sup>31)</sup>가 주장한  $Mg^{++}$ 에 의한 제 1 단계, 제 2 단계의 phosphorylation 과정과  $K^+$ 에 의해 일어나는 제 3 단계의 dephosphorylation 과정을 모두 억제 함으로써 Na-K-ATPase 활성을 억제하는 것으로 추측할 수 있으나, ethanol이 효소의 단백질 부분이나 혹은 지질 부분과 직접 작용할 때 ethanol의 구조가 양이온들의 구조와 유사하지 않기 때문에  $K^+$ 이나  $Mg^{++}$ 의 결합 부위에서 상경적으로 직접 작용할 가능성은 적다.

Na-K-ATPase는 세포막에 결합하고 있는 효소로서 그 활성을 나타내기 위해서는 phospholipid를 필요하기 때문에<sup>22)</sup> ethanol의 억제효소가 효소단백질의 hydrophobic 부분이나 혹은 지질부분과 밀접한 관계를 가지고 있을 가능성이 많다.

Grisham 및 Barnett<sup>10)</sup>은 ethanol이 세포막 지질층의 용해성(fluidity)을 증가시킨다고 하였으며 신장<sup>10)</sup>과 뇌<sup>27)</sup> 조직에서 ATPase의 억제 정도가 alcohol의 지방 탄소수와 비례하며 또한 alcohol의 지방 용해성과 직접 비례함이 보고되었다. 또한 본 실험에서도 arrhenius plot한 결과 ethanol 존재시 회절점이 변화되어 짐으로써 ethanol이 효소에 결합된 지질층에 교란을 일으킴으로써 지질층의 지방용해성이 변화되어 Na-K-ATPase 활성을 억제할 것으로 추측되어진다.

## 결 론

고양이 신장 Na-K-ATPase 활성에 대한 ethanol의 효과를 관찰하고 그 작용기전을 규명하기 위하여 효소역학적 분석을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Na-K-ATPase 활성은 1%보다 높은 ethanol 농도에서 억제되었으며, 7.5% 농도에서 효소 활성이 50% 억제되었다.

2. ATP가 분해되는 정도는 incubation 시간에 따라 증가되어졌으나 8% ethanol에 의한 억제 정도는 변함이 없었으며, preincubation 시간에 따라서는 15% ethanol의 농도에서는 차이를 보였다.

3. ethanol에 의한 억제 정도는 효소농도 변화에 따라서 변화되지 않았으며 억제양상은 가역적인 결과를 보였다.

4. 효소역학적 분석결과 ethanol은 ATP와  $Na^+$ 에 의한 효소 활성에는 non-competitive inhibition 양상을 보이고,  $Mg^{++}$ 과  $K^+$ 에 대하여서는 competitive inhibition 양상을 보였다.

5. Arrhenius plot결과 Na-K-ATPase 활성은 21°C와 30°C에서 회절되어졌으며, ethanol 존재시는 18°C에서 단 회절되어졌다.

이상의 결과로 보아 ethanol은 고양이 신장 Na-K-ATPase 활성을 가역으로 강력하게 억제하며 이러한 효과를 ethanol이 효소의 지질층에 존재하는 미세환경을 교란시킴으로써 억제효과를 나타낸 것으로 추측된다.

## 参 考 文 献

1. Ahmed, K. and Thomas, B.S.: The effects of long chain fatty acids on sodium plus potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. *J. Biol. Chem.* (1971) 246 : 103.
2. Albers, R.W.: Biochemical aspects of active transport. *Ann. Rev. Biochem.* (1967) 36 : 727.
3. Auditore, J.V.: Character of G-strophanthin inhibition of  $Na^+ + K^+$  activated ATPase. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* (1964) 149 : 90.
4. Beyer, K.H., Bear, J.E., Michaelson, J.K. and Russo, H.F.: Renotropic characteristics of ethacrynic acid: a phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1965) 147 : 1.
5. Bonting, S.L., Simmon, K.A. and Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Arch. Biochem. Biophys.* (1961) 95 : 416.
6. Dunham, E.T. and Gynn, I.M.: Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J. Physiol.* (1961) 156 : 274.
7. Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* (1925) 66 : 375.
8. Garrahan, P. J. and Glynn, I.M.: The stoichiometry of the sodium pump. *J. Physiol.* (1967) 192 : 217.
9. Glynn, I.M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmacol. Rev.* (1964) 16 : 381.
10. Grisham, C.M. and Barnett, R.E.: The effect of long-chain alcohol on membrane lipids and ( $Na^+ + K^+$ ) -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* (1973) 311 : 417.

11. Henderson, G. I., Turner, D., Patwardhan, R.V., Lumeng, L., Hoyump, A.M. and Schenker, S.: Inhibition of placental valine uptake after acute and chronic maternal ethanol consumption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1981) 216 : 465.
12. Hoffman, J.F.: The link between metabolism and active transport of  $\text{Na}^+$  in red cell ghosts. *Fed. Proc.* (1960) 19 : 127.
13. Hook, J.B.: A positive correlation between natriuresis and inhibition of renal Na-K-adenosine triphosphatase by ouabain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1969) 131 : 731.
14. Hoyumpa, A. M. and Nichols, S.G.: Effect of ethanol on intestinal (Na,K) ATPase and intestinal thiamine transport in rats. *J. Lab. Clin. Med.* (1977) 90 : 1086.
15. Katz, A. I. and Epstein, F. H. :The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney. *J. Clin. Invest.* (1967) 46 : 1999.
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.D., Farr, A. L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951) 193 : 265.
17. Matsui, H. and Schwartz, A.: Kinetic analysis of ouabain  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  interaction on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -dependent adenosinetriphosphatase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1966) 25 : 147.
18. Nechay, B.R. and Nelson, J.A.: Renal ouabain-sensitive adenosine triphosphatase activity and  $\text{Na}^+$  reabsorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1970) 175 : 717.
19. Nelson, J.A. and Nechay, B.R.: Effects of cardiac glycosides on renal adenosine triphosphatase activity and  $\text{Na}^+$  reabsorption in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1970) 175 : 727.
20. Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.: Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* (1960) 235 : 1976.
21. Rosa, J. and Rubin, E.: Effects of ethanol on amino acid uptake by rat liver cells. *Lab. Invest.* (1980) 43 : 366.
22. Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* (1975) 27 : 3.
23. Segel, I.H.: Enzyme kinetics. John Wiley, New York. (1975)
24. Sen, A.K. and Post, R.L.: Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate dependent sodium potassium transport in the erythrocyte. *J. Biol. Chem.* (1964) 239 : 345.
25. Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* (1957) 23 : 394.
26. Stahl, W.L. and Broderson, S.H.: Localization of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in brain. *Fed. Proc.* (1976) 35 : 1260.
27. Sun, A.Y. and Samorajski, T.: Effects of ethanol on the activity of adenosine triphosphatase and acetylcholinesterase in synaptosomes isolated from guinea pig brain. *J. Neurochem.* (1970) 17 : 1365.
28. Torretti, J., Hendler, E., Weinstein, E., Longnecker, R.E. and Epstein, F.H.: Functional significance of Na-K-ATPase in the kidney: effects of ouabain inhibition. *Am. J. Physiol.* (1972) 222 : 1398.
29. Wheeler, K.P. and Whittam, R.: Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant of active cation transport. *Biochem. J.* (1962) 85 : 495.
30. Whittam, R. and Ager, M.E.: Vectorial aspects of adenosine triphosphatase activity in erythrocyte membrane. *Biochem. J.* (1964) 93 : 337.
31. Whittam, R. and Wheeler, K.P.: Transport across cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* (1970) 32 : 21.
32. 김용근: Ethanol이 고양이의 신피질 절편에서의 P AH 이동 및 Na-K-ATPase 활성에 미치는 영향. 부산의대잡지 (1982) 22 : 215.
33. 서덕준:  $\text{Pb}^{2+}$ 가 가토 태너피질 Na-K-ATPase에 미치는 영향. 부산의대잡지 (1980) 20 : 143.

## **Effects of Ethanol on Na-K-ATPase Activity of Cat Kidney**

Joo-Heon Kim, D.V.M., M.S.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongsang National University*

Yong-Keun Kim, D.V.M., M.S., Ph.D.

*Department of Physiology, College of Medicine, Busan National University*

### **Abstract**

The effects of ethanol on Na-K-ATPase activity were investigated with cat kidney homogenate.

The results were summarized as follows:

1. Na-K-ATPase activity was inhibited with dose-dependent manner by ethanol of higher concentration than 1%, and showed an estimated  $I_{50}$  (the inhibitor concentration to cause 50% inhibition) of 7.5%.
2. Hydrolysis of ATP was linear with the incubation time in the absence and presence of 8% ethanol, whereas it was different with preincubation time in the presence of 15% ethanol.
3. Inhibition of Na-K-ATPase activity by ethanol was not affected by increased enzyme concentration, and showed the reversibility of the inhibitory pattern.
4. Kinetic studies of cationic-substrate activation of Na-K-ATPase showed that ethanol had both properties of classical competitive inhibition for  $Mg^{++}$  or  $K^+$  and non-competitive inhibition for ATP or  $Na^+$ .
5. Arrhenius plot yield two break point at 21° and 30°C in the absence of ethanol, whereas showing only one break point at 18°C in the presence of 8% ethanol.

These results suggested that ethanol inhibited Na-K-ATPase activity reversibly through a disturbance of microenvironment of lipids associated with the enzyme.