

Rat에서 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 활성도와 Na^+ , K^+ 배설에 미치는 질산 우라늄의 영향

이 기호 · 윤 택 구

한국에너지연구소 원자력 병원
생화학 연구실

요 약

우라늄 피폭으로 발생하는 다뇨증과 급성 신부전증의 원인을 밝히기 위하여, 질산 우라늄을 정맥주사한 후 소변으로 배설되는 Na^+ , K^+ 의 전해질 양과 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ adenosine triphosphatase ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase) 활성도 변화를 측정하였다. 질산 우라늄 투여 24시간 이내에 Na^+ , K^+ 의 배설량이 크게 증가하였고, 투여 3일 후에는 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 이때 Na^+ , K^+ 의 소변내 농도도 정상 대조군 범위 이하였다. 한편 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 활성은 투여 3일후에 고농도 질산 우라늄 투여(30mg/kg BW) 시에만 감소하였고, 저농도 투여군(5 mg/kg BW, 15mg/kg BW)에서는 활성 변화가 없었다.

I. 서 론

웅성 백서 혈관내에 주입된 우라늄 화합물은 24시간 이내에 백서의 체중 감소와 다갈증을 유발하며 24시간 후 부검 소견상 비장 출혈과 함께 신장의 수성 변화 및 세뇨관 피사등 급성 신부전증을 나타내었고 혈청내 BUN, creatinine의 증가현상을 보이는 병변을 관찰하였다[1] 특히, 수용성 우라늄 화합물의 배설은 신장을 통하여 이루어지므로 유발된 다뇨증과 세뇨관 피사등 급성 신부전증의 원인을 밝히는 것은 중요하다.

다뇨증이 발생하는데는 여러가지 원인이 있겠으나, 신장에서 Na^+ 의 재흡수가 억제될 때 다뇨현상이 발생하며 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase의 억제제인 cardiac glycoside를 투여했을 때 Na^+ 의 재 흡수가 억제되는 동시에 다뇨현상이 일어난다고 보고된 바있다[2, 3]. 또한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase는 신장이외의 다른 조직에서도 Na^+ 의 능동 이동에 중요한 역할을 하며[4] 신장에서는 Henle's loop에서 특히 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 활성이 크고 근위곡 세뇨관의 Na^+ 이 재 흡

수되는 곳인 peritubular border에 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 효소가 존재한다고 알려져 있다[5].

우라늄을 투여했을 때 표적되는 부위는 근위곡 세뇨관이며[6] 다뇨증이 발생하는 원인이 Henle's loop의 기능상실이라고 보고한 바 있다[7]. Nechay 등[8]은 우라늄 이온이 in vitro에서 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase의 Na^+ site에서 활성을 억제시키고, 질산 우라늄 투여로 소변내 전해질의 배출이 증가한다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 우라늄 피폭으로 인한 다뇨증이 발생하는 신부전증의 원인을 밝히기 위하여 질산 우라늄을 정맥 주사한 후 소변으로 배설되는 Na^+ , K^+ 의 전해질 양과 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase의 활성도 변화를 측정하였다.

II. 실험방법

1. 체중·수분 섭취량 및 소변 배설량 측정

Metabolic cage 안에서 일정기간 적응시킨 체중 150g 내외의 Sprague Dawley rat에 5 mg/kg, 15mg/kg, 30mg

의 질산우라늄 [$UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$] 수용액 (Art Merck, in 5% (w/v) $NaHCO_3$, pH 7.0-7.2) 을 꼬 정맥에 주사하였다. 정상 대조군에는 5% (w/v) 의 $NaHCO_3$ 용액을 (ml/kg) 주사하였다.

주사후 rat를 희생시키기 전까지 24시간 동안 체 중변화 및 섭취한 물과 소변량의 변화를 측정하였다.

2. 소변내 Na^+ 및 K^+ 양 측정

수거한 소변을 3배와 40배로 각각 희석한 후 Na^+ 과 K^+ 의 양을 flame photometer (IL433, Instrument Laboratory) 로 측정하였다.

3. Microsomal Fraction 분리

Rat 신장의 microsomal fraction은 Philipson 등 [9]의 방법을 변형하여 분리하였다. Metabolic cage 안에서 일정기간 동안 적응 시킨 rat에 질산 우라늄 수용액을 주사한 후 1일, 3일, 5일 및 10-12일 사이에 좌우 신장을 절제하였다. 절제한 신장을 3ml의 homogenization 용액 (0.25M sucrose, 30mM imidazole, 5mM Tris·Cl, pH 6.8, 5mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton x-100) 에 넣어 조직 분쇄기 (Brinkman) 로 분쇄한 후 4℃에서 20분간 8,000g로 원심 분리 (RC-5 C, Sorval) 하여 얻은 상정액을 -70℃에서 하룻밤 동결시켰다. 동결된 조직의 균질액을 해동시켜 15ml의 설탕용액 (0.25M sucrose, 125mM Tris·Cl, pH 7.2, 1mM EDTA) 으로 혼합한 후 4℃에서 10분간 10,000g에서 원심 분리하였다.

상정액을 취하여 Beckman (L8-70M) type 65 rotor로 33,800rpm에서 60분간 초원심 분리 하였다. 침전된 microsomal fraction을 TE 완충액 (125mM Tris·Cl, 1mM EDTA, pH 7.2) 에 녹여 -70℃에 보관하였다가 $Na^+ - K^+ ATPase$ 측정 에 사용하였다.

4. $Na^+ - K^+ ATPase$ 활성도 측정

$Na^+ - K^+ ATPase$ 활성도 측정은 Philipson 등 [9]의 방법에 따라 측정하였다. 즉 1.5ml의 효소 반응액 (100mM NaCl, 20mM KCl, 3mM Na_2ATP , 5mM $MgCl_2$, 20mM imidazole, 5mM NaN_3 , 50mM Tris·Cl, pH 7.4, 0.01mM EDTA) 에 microsomal fracti-

on의 단백질을 50-200 μ g가하여 총 ATPase를 측정하고, NaCl과 KCl이 없는 위의 효소 반응액에 1mM의 ouabain (0-3125, Sigma) 을 첨가하여 ouabain에 의하여 억제 받지 않는 ATPase 활성을 측정하였다. 37℃에서 15분간 반응 시켰으며 30% (w/v) 의 냉각된 trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시켰다. 6,000g에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상정액 일정량을 취하여 효소 반응액중 생성된 무기인산을 Pi Kit (AM 123-K, Asan) 를 사용하여 spectrophotometer (DU-8B, Beckman) 로 측정하였다.

III. 결 과

1. Na^+ 배설량의 변화

질산 우라늄 주사후 24시간 간격으로 5일 동안 소변으로 배설되는 Na^+ 양의 변화를 Sprague Dawley rat에서 측정하였다 (Fig. 1). 질산 우라늄 주사후 24시간이 경과하면 Na^+ 이 희석되어 배설되기 시작하며 3,4일 지나면 대조군에 비하여 1/5-1/8 수준으로 희석되어 배설되었다. 이때 질산 우라늄 투여군간에 Na^+ 이 희석되어 배설되는 정도는 거의 차이가 없었으나 고농도 투여군 (30mg/kg) 에서 조금 더 희석되어 배설되는 경향이 있었다.

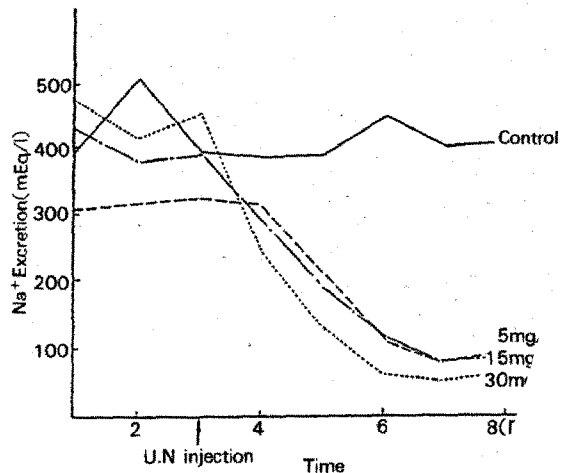


Fig. 1. Changes of Na^+ concentrations in urini Sprague Dawley rats injected with u nitrate solutions.

24시간 동안 배설되는 Na^+ 의 절대량 변화를 rat 체중 kg당 mg으로 측정하였다 (Fig. 2). 질산 우라늄 투여 24시간 이후부터 소변으로 배설되는 Na^+ 량은 증가하기 시작하였다. 30mg/kg 투여군에서는 24시간 후에 대조군에 비해 크게 증가한 후 감소하기 시작하여 2-3일 후에는 대조군 수준으로 감소하였으며 3일 이후에는 대조군 이하로 더욱 감소하였다. 저 농도 투여군 (15mg/kg, 5 mg/kg) 에서는 질산 우라늄 투여 24시간 후 배설되는 Na^+ 양이 증가하여 48시간 이후 최고치를 기록한 후 감소하기 시작하여 4일 이후에는 대조군 이하로 감소하였다.

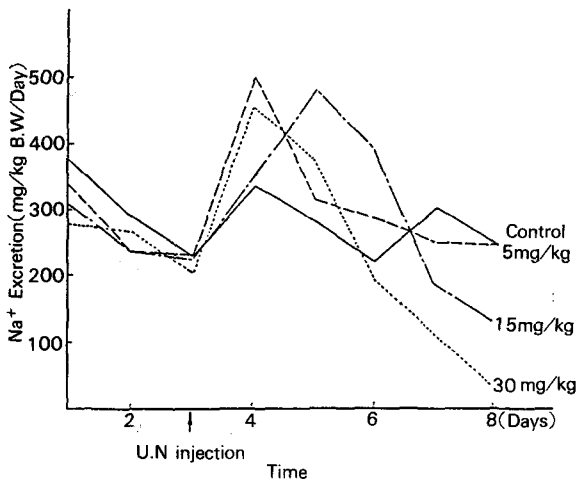


Fig. 2. Effect of different doses of uranyl nitrate on Na^+ excretion.

2. K^+ 배설량의 변화

질산 우라늄 주사 후 24시간 간격으로 5일 동안 소변으로 배설되는 K^+ 양의 변화를 측정하였다. (Fig. 3). 소변으로 배설 되는 K^+ 양의 변화도 Na^+ 양의 변화와 유사하였다. Sprague Dawley rat 에 질산 우라늄을 주사하면 K^+ 이 희석되어 배설되기 시작하여 2-3일 이후에는 대조군에 비하여 1/4-1/6 이하로 감소하였다.

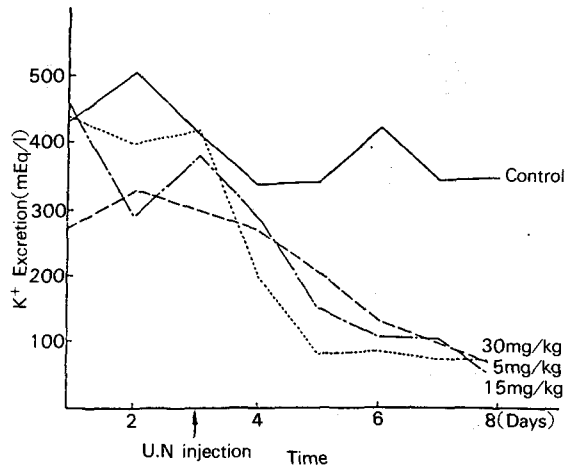


Fig. 3. Changes of K^+ concentrations in urine of Sprague Dawley rats intravenously injected with uranyl nitrate solutions.

질산 우라늄 투여 후 24시간 동안 배설되는 K^+ 의 절대량 변화를 측정하였다 (Fig. 4). 고농도 투여군 (30mg/kg) 에서는 질산 우라늄 투여 24시간 후에 K^+ 의 배설량이 최대로 달하였다가 감소하기 시작하여 3일 이후에는 대조군 이하로 배설되었다.

15mg/kg 및 5mg/kg 투여군에서는 질산 우라늄 투여 후 배설되는 K^+ 이 증가하여 2-3일간 지속된 다음부터는 대조군 이하로 감소 하였다.

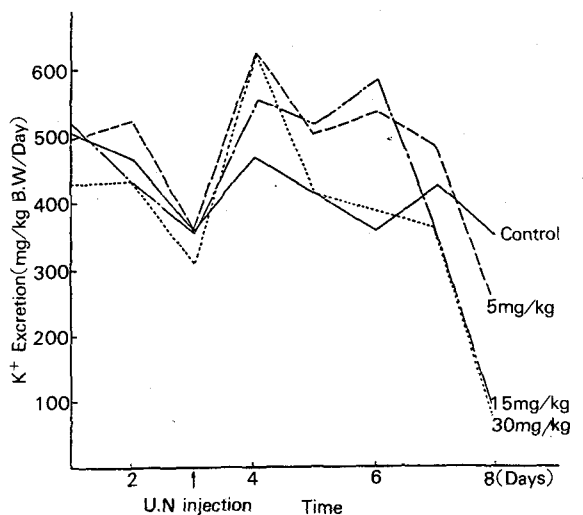


Fig. 4. Effect of uranium poisoning on K^+ excretion.

3. 소변 배설량과 Na⁺, K⁺ 배설량과의 관계

질산 우라늄 투여로 배설이 증가된 Na⁺ 및 K⁺의 양과 소변 증가량과의 관계를 알아보았다(Fig. 5). Na⁺ 및 K⁺의 배설량과 소변량의 변화는 각 시험군에서 비슷한 경향을 보였다. 정상 대조군에서도 소변량 변화에 따라 Na⁺과 K⁺의 배설이 유사하게 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 5 mg/kg 투여군에서는 소변량이 증가함에 따라 Na⁺ 과 K⁺의 배설이 증가하였으나, 질산 우라늄 투여 3 - 4 일 후 Na⁺과 K⁺의 배설이 감소할 때도 소변량은 계속 증가한 상태를 유지하고 있었다. 15mg/kg 투여군 및 30mg/kg 투여군에서는 소변량 증가에 따라 Na⁺ 및 K⁺의 배

설이 증가하였고 소변량이 감소함에 따라 Na⁺ 과 K⁺의 배설은 더욱 급격히 감소하여 질산 우라늄 투여 5 일 후에는 정상치의 1/3 이하로 배설되었다

이 결과로부터 소변의 배설량과 Na⁺ 및 K⁺의 배설량과는 꼭 일치하지는 않았으나 소변량에 따라 Na⁺ 및 K⁺의 배설량이 많은 영향을 받는다는 사실을 알 수 있었다. 정상 대조군에서 소변량에 따라 Na⁺ 및 K⁺의 배설량이 변하는 것은 체내 삼투압 조절과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되며 질산우라늄 투여로 소변량에 따라 Na⁺ 및 K⁺ 배설의 증가가 있으나 소변으로 손실되는 Na⁺ 및 K⁺의 양에 비해 수분 손실이 크므로 체내 삼투압에 유의해야 할 것으로 생각 되었다.

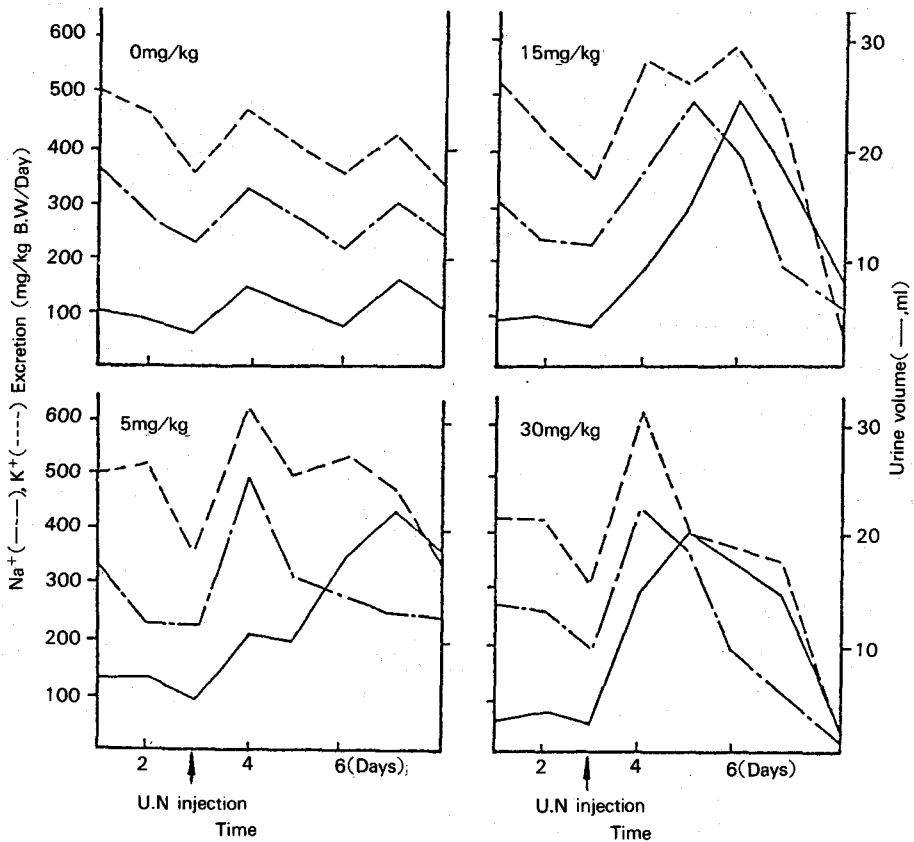


Fig. 5. Correlations between excretion rate of Na⁺ and K⁺ and urine amount.

4. 신장 microsomal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성도 변화

질산 우라늄을 투여한 1, 3, 5일 및 10-12일 후에 신장에서 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 의 특이 활성도를 측정하였다 (Table 1). 비교군계 Sprague Dawley rat에 30mg/kg의 질산 우라늄 투여후 24시간이 경과하

면 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성이 감소되기 시작하여 투여 3일후에는 대조군의 1/2 수준으로 활성도가 감소하였다. 투여 5일후에는 정상대조군 수준으로 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성이 회복되었다. 그러나 질산 우라늄 15mg/kg 투여군에서는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성도 변화가 거의 없었다.

Table 1. Changes of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ in the kidney of Sprague Dawley rats intravenously injected with uranyl nitrate solutions.

Treatment of U.N. (mg/kg BW)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ($\mu\text{mol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$)			
	1 day	3 days	5 days	10 days
30	*33.5	27.9	41.7	ND
15	45.2	41.1	42.5	42.4
5	51.9	64.3	41.0	41.6
0	44.4±4.5	44.4±4.5	44.4±4.5	44.4±4.5

*Each was the mean of triplicated values.

IV. 고 찰

본 연구에서는 급성 세뇨관 괴사를 유발하며 다뇨 현상을 나타내는 우라늄 질산 화합물의 신부전증에 대한 원인을 규명하기 위한 일환으로 다뇨증의 생화학적 원인으로 많이 연구된 Na^+ 의 재흡수와 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성도의 관계 [10, 11, 12]를 파악하기 위하여 질산 우라늄 투여후 Na^+, K^+ 의 소변을 통한 배설과 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성 변화를 측정하였다.

Sprague Dawley rat에 질산 우라늄 투여후 (30mg/kg, 15mg/kg, 5 mg/kg) 24시간 간격으로 소변 및 Na^+ 과 K^+ 배설량을 측정된 결과, 질산 우라늄 투여후 24시간이 지나면 모든 실험군에서 소변의 증가와 함께 Na^+ 과 K^+ 의 배설도 증가하였으나 (Fig. 5) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 의 활성은 30mg/kg 투여군에서만 감소하였다 (Table). 질산 우라늄 투여 3일 이후에는 소변의 감소와 함께 Na^+ 과 K^+ 의 배설은 정상이하로 더욱 감소하였다. 그러나 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성은 투여 3일후에 30mg/kg 투여군에서만 정상 대조군의

1/2 수준으로 감소 하였다가 투여 5일후에는 정상 수준으로 회복되었다. 이와같이 소변 및 Na^+, K^+ 배설증감에 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성은 밀접하게 변화하지 않았다.

여기서 얻은 결과에서는 ouabain에 의한 Na^+ 재흡수 감소와 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성도 저하가 밀접한 관계가 있다는 많은 보고 [2, 3, 5, 13]와 차이를 볼수 있으나, 이와 같은 보고는 신장 동맥에 직접 ouabain을 투여하여 얻은 것이며, 이러한 방법상의 차이가 결과에 영향을 미친 듯도 하였다. 또한 이 보고도 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 의 활성이 40% 이상 억제되어야 비로소 natriuresis에 들어가기 시작하며 [5] $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성이 완전히 억제되었을 경우에도 사구체에서 여과된 Na^+ 의 60-70%가 재흡수가 일어난다는 사실로 미루어 [3] 우라늄에 의한 Na^+ 배설 증가엔 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 펌프 이외에 다른 기전에 손상이 있었을 것으로 생각되었다.

또한 우라늄 이온에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 의 활성 저하가 *in vitro* 실험에서 밝혀졌지만 *in vivo*에

서는 우라늄 이온과 결합할 수 있는 bicarbonate, phosphate, carboxylic acid, citrate 및 이를 포함하는 혈장 단백질에 의해서 우라늄에 의해서 우라늄 피폭에 따른 Na^+ - K^+ ATPase 효소 활성도 저하 현상을 막을 수 있다는 연구 결과도 있다(8). 그리고 여러 종류의 이노제에 의한 다뇨증의 원인으로 Na^+ - K^+ ATPase 활성억제제 외에 glycolysis, oxidative phosphorylation, adenylate cyclase 활성, prostaglandin dehydrogenase 활성, 미토콘드리아 Na^+ -stimulated ATPase, carbonic anhydrase 활성 억제 등이 보고되고 있다(5, 14). 그러므로 우라늄 투입으로 일어나는 Na^+ 의 배설 증가와 곧이은 Na^+ 의 배설 감소는 Na^+ - K^+ ATPase의 활성 변화와 밀접하게 변화하지 않았으므로 이 효소계 이외의 다른 요인을 생각할 수도 있다고 본다.

V. 결 론

수용성 질산 우라늄을 Spague Dawley rat에 5 mg/kg, 15mg/kg 및 30mg/kg 꼬리정맥에 주사하였을 때 관찰되는 심한 다뇨, 다갈증의 원인을 규명하고자 소변으로 배설되는 Na^+ 및 K^+ 양과 신장의 Na^+ - K^+ ATPase 활성 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 질산 우라늄을 주사한지 24시간 경과하면 Na^+ 과 K^+ 의 배설량이 증가 하였으나 3일 이후에는 대조군 이하로 배설량이 감소 하였다.
2. 소변 내 Na^+ 과 K^+ 의 농도는 질산 우라늄 투여 후 희석되어 배설되기 시작하여 투여 7일 후에는 대조군의 1/6 - 1/8 수준으로 희석되어 배설 되었다.
3. 정상 대조군의 경우 Na^+ 과 K^+ 의 배설량은 소변량의 변화와 밀접하였다. 그러나 질산 우라늄 투여군에서는 투여 3일후에 Na^+ 과 K^+ 배설량은 대조군 이하로 감소 하였으나 다뇨 현상은 7일까지 계속 되었다.
4. 질산 우라늄 고농도 투여군(30mg/kg)에서만 투여후 24시간 이내에 Na^+ - K^+ ATPase 활성이 감소 하기 시작하여 3일 후에는 정상 대조군

의 1/2로 감소하였고 5일 이후에는 정상으로 회복되었다.

이상과 같은 결과로부터 소변으로 손실되는 Na^+ 과 K^+ 양보다 수분의 손실량이 더 크므로 체내의 삼투압에 이상이 왔을 것으로 생각되었다. 따라서 우라늄 방사선 피폭시 세포 내외의 K^+ , Na^+ 농도 유지에 유의 해야 할 것으로 사료 되었다. 한편 Na^+ 의 배설 증가와 함께 다뇨증을 발생시키는 원인은 Na^+ - K^+ ATPase 활성 저해 일것으로 생각하고 실험한 결과, 질산 우라늄 30mg/kg 투여군에서만 Na^+ - K^+ ATPase 활성이 감소하므로, Na^+ - K^+ ATPase 변화만으로 Na^+ 배설 증가와 다뇨증을 동시에 설명하기는 곤란하였다.

Reference

1. I.K. Lim, K.H. Lee, B.D. Han, J.J. Jang and T.K. Yun "Uranyl nitrate induced polyuric acute tubular necrosis in rats," *Yonsei Medical Journal* 28 (1), 38. (1987).
2. B.R. Nechay and J.R. Nelson "Renal ouabain sensitive adenosine triphosphatase activity and Na^+ reabsorption," *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175, 717 (1970).
3. J.A. Nelson and B.R. Nechay "Effects of cardiac glycosides on renal adenosine triphosphatase activity and Na^+ reabsorption in dogs," *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175, 727(1970).
4. J.C. Skou "Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane," *Physiol. Rev.* 45, 596 (1965).
5. B.R. Nechay "Biochemical basis of diuretic action," *J. Clin. Pharmacol.* 17, 626 (1977).
6. K. Nomiya and E.C. Foulkes "Some effects of uranyl acetate on proximal tubular functions in rabbit kidney," *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 13, 89 (1968).
7. F.J. Bowman and E.C. Foulkes "Effects of uranium on rabbit renal tubules," *Toxicol. Appl. Phar-*

- macol.* 16, 391. (1970).
8. B.R. Nechay J.D. Thompson and J.P. Saunders "Inhibition by uranyl nitrate of adenosine triphosphatases derived from animal and human tissues," *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 410 (1980).
 9. K.D. Philipson and I.S. Edelman "Characteristics of thyroid-stimulated Na^+ - K^+ ATPase of rat heart," *J. Physiol.* 232(3), c202(1977).
 10. K.A. Fisher, L.G. Welt and J.P. Hayslett "Dissociation of Na^+ - K^+ ATPase specific activity and net reabsorption of sodium," *Amer. J. Physiol.* 229, 524. (1975).
 11. M. Martinez-Maldonado, J.C. Allen, G.Enoyan, W. Suki and A. Schwartz "Renal concentration mechanism : Possible role for sodium-potassium activated adenosine triphosphataes," *Science* 165, 807 (1969).
 12. M. Martinez-Maldonado, J.C. Allen, C. Inagaki, N. Tsaparas and A. Schwartz "Renal sodium-potassium activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption," *J. Clin. Invest.* 51, 2544 (1972).
 13. J. Torretti, E. Hendler, E. Weinstein, R.E. Longnecker and F.H. Epstein "Functional significance of Na^+ - K^+ ATPase in the kidney : Effects of ouabain inhibition," *Amer. J. Physiol.* 222, 1398 (1972).
 14. A. Schwartz, G.E. Lindenmayer and J.C. Allen "The sodium-potassium adenosine triphosphatase ; Pharmacological, physiological and biochemical aspects," *Pharmacol. Rev.* 27,5 (1975)

Effects of Uranyl Nitrate on Na^+ - K^+ Adenosine Triphosphatase Activity and Excretion of Na^+ and K^+ in Rats

Kee Ho Lee and Taik Koo Yun

Laboratory of Biochemistry, Korea Cancer Center Hospital

Korea Advanced Energy Research Institute

Seoul, Korea

ABSTRACTS

In order to evaluate the cause of polyuric acute tubular necrosis, we measured electrolytes, Na^+ and K^+ excreted in urine, and activities of Na^+ - K^+ adenosine triphosphatase (Na^+ - K^+ ATPase). Excretion of Na^+ and K^+ significantly increased in 24hr exposure on the uranyl nitrate and then decreased below the normal level after 3 days. The concentration of Na^+ and K^+ in urines of the rats treated uranyl nitrate was less than that of the normal rats. The activities of Na^+ - K^+ ATPase decreased only in the group treated with high dose group of uranyl nitrate (30mg/kg BW) on the 3rd day but were not changed in the low dose groups(5 mg/kg BW and 15mg/kg BW).