

Vanadate가 소장절편 및 소장세포막의 Vesicle에서 포도당 이동에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 종 식 · 김 구 자

= Abstract =

The Effect of Vanadate on Glucose Transport of Everted Sacs and Vesicles Prepared from Small Intestinal Epithelial Cells

JS Hah and KJ Kim

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Vanadate has been reported to inhibit Na^+ , K^+ -ATPase of many cells. Since intestinal uptake of glucose is influenced by the enzyme, we studied the effects of varying concentrations of sodium vanadate (NaVO_3) on the glucose transport in everted sacs prepared from the segment of jejunum and upper part of ileum of rabbit.

At concentrations of range 10^{-8}M ~ 10^{-4}M vanadate decreased the mucosal-to-serosal flux (S/M ratio) of glucose to 4.8% -38.8% accompanying inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activities of basolateral membranes and alkaline phosphatase activities of brush-border membranes purified from small intestinal epithelial cells.

On the other hand, it was found that there were two cytochalasin B binding sites at the basolateral membranes, of which site I showed a dissociation constant of $1.8 \times 10^{-6}\text{M}$ with maximal binding capacity of 26 pmoles/mg protein and site II showed a dissociation constant of $9.3 \times 10^{-7}\text{M}$ with maximal binding capacity of 140 pmoles/mg protein. Vanadate (10^{-4}M) inhibits cytochalasin B binding at the both binding sites to 38.5% and 45.7% respectively.

Vanadate also inhibited cytochalasin B binding at both ghost membranes and band 4.5 (glucose carrier) protein purified from human red blood cell membranes.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that there existed a band 4.5 like protein in both basolateral membrane and brush-border membrane.

Based on the above results the following conclusions are obtained :

1) Glucose is absorbed across the small intestinal epithelium by a two stage process, the first is sodium co-transport system of the brush-border membrane and the second is sodium-independent facilitated diffusion system of the basolateral membrane.

2) The driving force for the transcellular movement of glucose is mainly dependent on sodium concentration gradient across the brush-border membrane which is generated by Na^+ , K^+ -ATPase

at the basolateral membrane and also dependent directly on the activity of glucose carrier which may exist at the basolateral membrane.

3) Vanadate inhibits glucose uptake across the intestinal epithelium by affecting on both the Na^+ , K^+ -ATPase and glucose carrier of the basolateral membrane.

서 론

실험재료 및 방법

포도당은 소장점막에서 확산, 촉진적 확산(facilitated diffusion) 및 능동적 과정을 통하여 흡수 되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 주흡수 경로를 보면 포도당은 소장점막층의 brush-border막을 통과하여 소장상피 세포내로 들어와 세포질내에서의 이동을 거쳐 장막층의 basolateral 막을 통과하여 혈액속으로 흡수되는데, 소장에 있는 brush-border 막과 basolateral 막은 형태와 기능상의 이질성(heterogeneity) 때문에 포도당을 이동시키는 기전을 달리 하고 있다²⁾. 즉 brush-border 막에는 " Na^+ -glucose cotransporter"가 존재하여 막내외의 Na^+ 농도 경사에 따라 Na^+ 이 세포질내로 이동할때 포도당이 협동적으로 세포질내로 이동하게 되며 장막층의 basolateral 막에는 (Na^+ , K^+)-ATPase/pump가 존재하여 Na^+ 이온을 장액쪽으로 이동시킬 때 세포질내에 남게 되는 포도당은 그 농도가 증가하여 basolateral 막을 수동적으로 이동하는 것으로 알려져 있다³⁾. 그러므로 포도당 이동의 원동력은 (Na^+ , K^+)-ATPase/pump에 의한 세포막 내외의 Na^+ 이온농도 경사에 있다고 할 수 있다.

한편 Charney등⁴⁾이 Sigma 회사제품의 ATP에 (Na^+ , K^+)-ATPase의 억제물질이 존재하는 것을 발견하였고, Cantley등⁵⁾은 이 물질이 vanadate라는 것을 밝힌 후 vanadate의 생물학적 작용에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. Vanadate가 (Na^+ , K^+)-ATPase를 억제한다면 이는 (Na^+ , K^+)-ATPase에 의하여 일어나는 basolateral 막의 포도당 이동에도 영향을 줄 것으로 생각되나 아직 이것에 관한 연구보고는 없다. 따라서 본 연구의 목적은 vanadate가 소장에서의 포도당 이동에 미치는 영향을 관찰하여 포도당 이동 기전의 일부를 밝히고져 본 실험에 착수하였다.

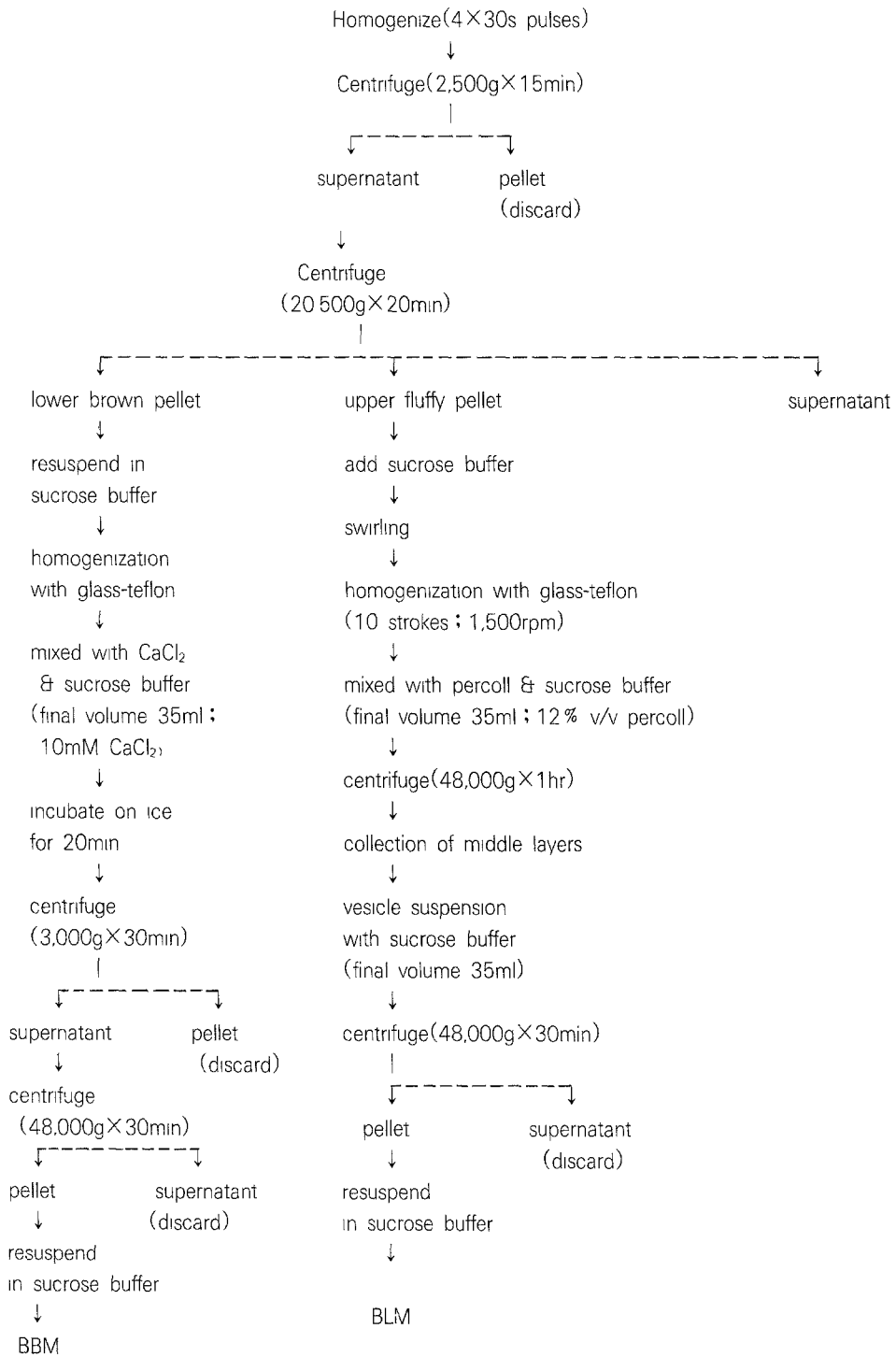
1. Everted Sac 제조

Vanadate가 소장에서 포도당 이동에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 Wiseman⁶⁾의 방법으로 "everted sac"을 만들었다. 즉 토끼를 두부강타로 희생시킨후 상부 소장을 적출하여 3-4cm 정도의 크기로 자르고 유리 봉을 이용하여 이를 뒤집어 sac을 만들었다. Sac내에는 Tyrode용액을 채우고 Tyrode용액으로 된 incubation medium에 37°C에서 1시간 동안 incubation한 후 sac내외의 포도당 농도를 Hawk등⁷⁾의 방법으로 측정하여 장막과 점막층의 비(S/M ratio)를 구하였다. Vanadate의 효과를 보기 위하여 sac내에 vanadate의 농도가 $10^{-6}\text{M}\sim 10^{-4}\text{M}$ 되게 첨가하고 같은 방법으로 S/M ratio를 구하여 대조군과 비교하였다.

2. Brush-border 막 Vesicles과 basolateral 막 vesicles 제조

Brush-border 막과 basolateral 막을 통한 포도당 이동 기전을 관찰하기 위하여 Maenz & Cheeseman⁸⁾의 방법으로 각 세포막의 vesicles을 제조하였다.

체중 약 2-3kg의 가토로부터 공장과 회장을 적출하여 뒤집고 생리적 식염수에 흔들흔들하면서 점막이 다치지 않도록 잘 씻은 후 sucrose buffer용액 (250 mM sucrose/2mM Tris-HCl(PH7.4)/0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)속에서 Scalera등⁹⁾의 방법으로 slide glass를 이용하여 점막을 긁어 모았다. 이를 teflon pestle을 이용하여 균질화 한 후 2,500×g에서 15분간 원심분리하고, 상층액을 다시 20,500×g에서 20분간 원심분리 하였다. 이때 두층의 침전물이 생기는데 한 층은 비교적 딱딱한 갈색의 침전물이고 그 위에 약간 부풀부풀한 또 한층의 흰색의 침전물이 형성된다. 여



Scheme 1. Flow scheme for the isolation of brush-border membranes and basolateral membranes from rabbit small intestinal epithelial cells.

기에 약 10ml의 sucrose buffer를 가한후 흔들흔들하면 흰색의 부풀부풀한 층이 쉽게 분리되는데 이를 다른 시험관에 옮겨 부어 이것으로부터 basolateral 막을 분리하였다. 나머지 딱딱한 침전물에도 10ml의 sucrose buffer를 가한 후 vortex로 진탕한 후 균질화하고 이것으로부터 brush-border막을 분리하였다.

Basolateral 막은 상기한 흰색의 상층 부유액을 glass-teflon homogenizer로 균질화하고 percoll/sucrose buffer(최종용적 35ml; 12% percoll, v/v)로 혼합한 후 48,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 density gradients 중 중간층을 sucrose buffer로 한번 더 원심분리하여 생긴 침전물로 부터 얻었다.

Brush-border 막은 갈색의 딱딱한 침전물의 부유액을 glass-teflon으로 균질화하고 CaCl₂sucrose buffer(최종용적 35ml; 10mM CaCl₂)로 혼합한 후 얼음속에서 약 20분간 흔들어 주다가 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 brush-border구성물이 아닌 침전물을 미리 제거하고 위의 상등액을 48,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물로 부터 얻었다(Scheme 1).

3. 표지효소(marker enzyme) 활성도 측정

분리된 brush-border 막과 basolateral 막에서 약물의 효과를 관찰하기 위하여 표지효소의 활성도를 측정하였다. Brush-border 막의 표지효소는 alkaline phosphatase를 측정하였고 basolateral 막의 표지효소는 (Na⁺, K⁺)-ATPase를 측정하였으며 측정방법은 Parkinson 등¹⁰⁾의 방법에 준하였다.

4. Cytochalasin B 결합실험

Brush-border 막과 basolateral막의 포도당운반체의 기능을 측정하기 위하여 포도당운반체의 상경적 억제 물질인 cytochalasin B의 결합능력을 Jung & Rampal¹¹⁾의 방법으로 측정하였으며, 이들 운반체의 특성을 비교할 목적으로 포도당운반체 중 그 특성이 잘 알려져 있고 비교적 순수하게 분리할 수 있는 적혈구막의 포도당운반체(band 4.5)를 Hah¹²⁾의 방법으로 얻은 후 같은 방법으로 cytochalasin B의 결합실험을 하였다.

5. 단백질의 전기영동분석

brush-border 막과 basolateral 막을 구성하고 있는 단백질의 종류를 관찰 비교하기 위하여 Laemmli¹³⁾방법으로 SDS-gel(10%) electrophoresis를 실시하였다.

6. 전자현미경적 관찰

Vesicle의 모양을 관찰하기 위하여 Hah¹⁴⁾의 방법으로 negative staining을 통한 전자현미경 관찰을 실시하였다.

7. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry¹⁵⁾의 방법으로 측정하였으며 표준단백질로 소혈청 단백질(bovine serum albumin)을 사용하였다.

8. 실험재료

NaVO₃는 Merck사(Darmstadt, FRG)로 부터, percoll, octylglucoside, cytochalasin B, Tris(hydroxymethyl) aminomethane, phenylmethylsulfonyl fluoride등은 Sigma사(St. Louis, USA)로 부터 구입하였다. 그의 시약들은 모두 일급시약으로 일본 또는 국내에서 구입하였다.

실험 결과

1. Vanadate가 Everted Sac에서 포도당 이동에 미치는 영향

Everted sac내에 vanadate의 농도가 10⁻⁸M-10⁻⁴

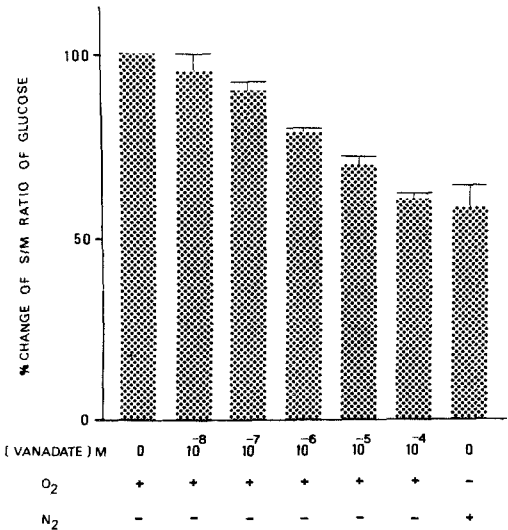


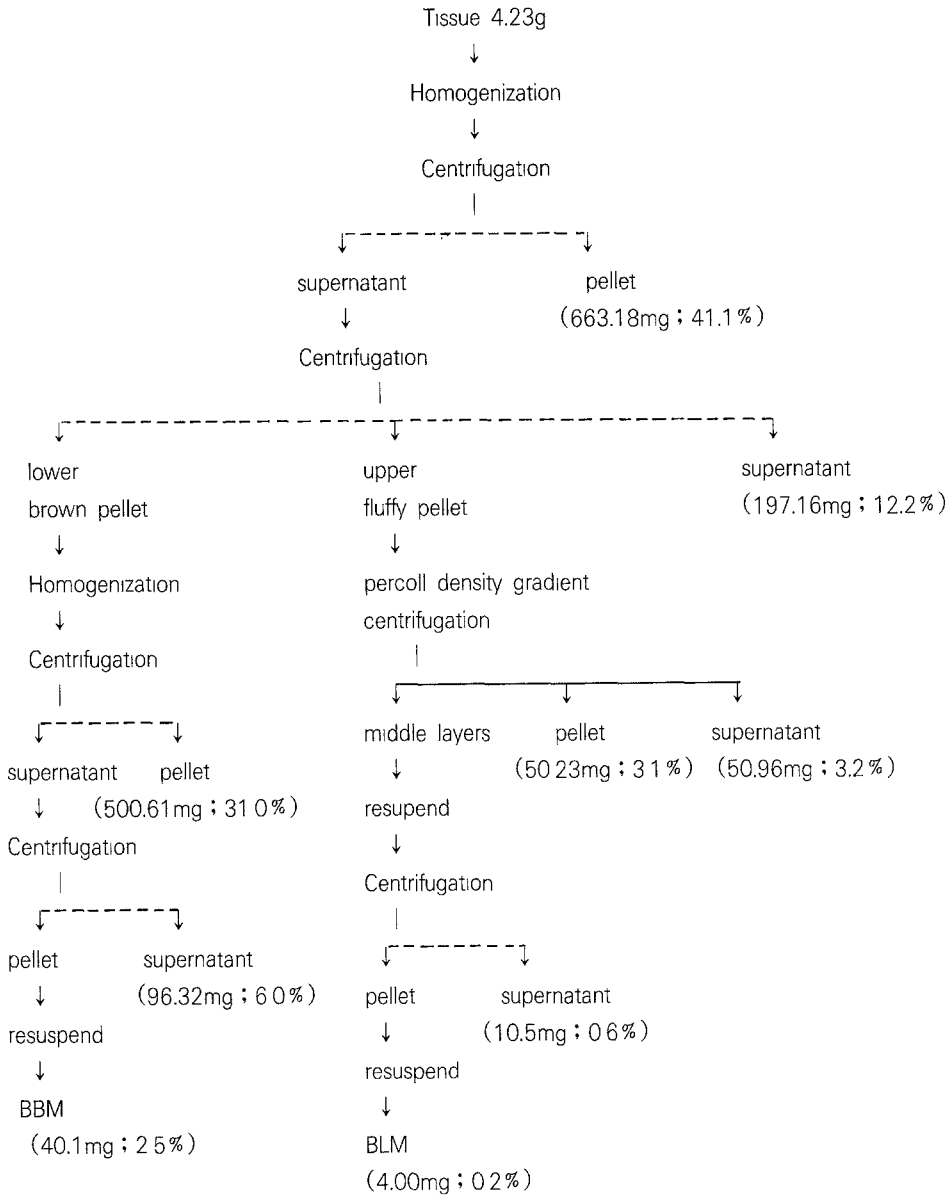
Fig. 1. Effect of vanadate on glucose transport in everted sacs prepared from rabbit small intestinal segments. Bars represent standard errors. "+" and "-" mean presence and absence of the environmental gas.

M되게 첨가한 후 포도당 이동에 미치는 영향은 그림 1에서 보는 바와 같다. 즉 vanadate는 포도당의 이동을 농도에 따라 각각 $10^{-8}M$ 은 $4.8 \pm 5.1\%$, $10^{-7}M$ 은 $10.1 \pm 2.5\%$, $10^{-6}M$ 은 $21.0 \pm 1.3\%$, $10^{-5}M$ 은 $29.2 \pm 2.5\%$ 그리고 $10^{-4}M$ 은 $38.8 \pm 1.2\%$ 로 억제시켰다. 이때 대사 기능을 억제시키기 위하여 산소공급을 중단하고 질소

를 공급한 군에서는 포도당의 이동이 약 41% 억제되었다.

2. 단백질 각 분획의 취득량

본 실험에서 분리한 각 단백질의 분포는 Scheme 2와 같다. 즉 1 마리의 가토(체중 2~3kg)로 부터 공장과 회장을 적출한 후 scraping방법으로 약 1.61g의 homo-



Scheme 2. Flow scheme showing the protein yields of brush-border membranes and basolateral membranes with the other proteins discarded during purification.

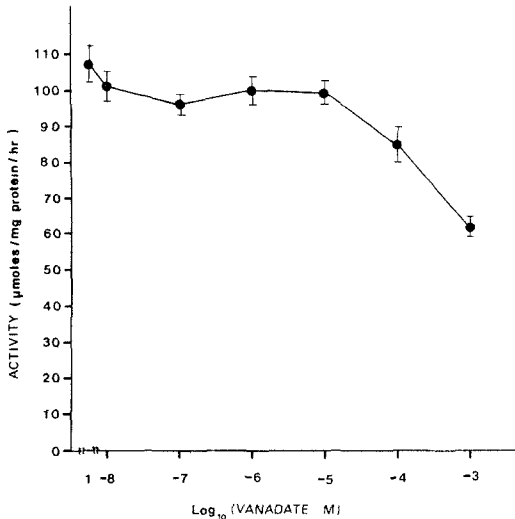


Fig. 2. Effect of vanadate on the alkaline phosphatase activity of brush-border membrane purified from the epithelia of upper part of rabbit small intestine. Bars represent standard errors.

genate를 얻을 수 있었으며 이로 부터 최종 basolateral 막 및 brush-border 막 분획의 단백질은 약 4mg 및 10.15mg으로 각각 전체의 약 0.2% 및 2.5%의 취득율을 보였다.

3. Vanadate가 Alkaline Phosphatase 활성도에 미치는 영향

Vanadate가 brush-border 막의 표지효소인 alkaline phosphatase의 활성도에 미치는 영향을 그림 2에 도

시하였다. 그림에서 보는 바와 같이 대조군의 alkaline phosphatase의 활성도는 107.42µM/mg protein/hr이었으며 vanadate를 각각 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 및 10⁻⁴M의 농도로 첨가하였을때 활성도는 101.02±4.26, 96.91±2.92(p<0.1), 100.23±3.99, 99.11±2.91, 84.98±5.24(p<0.01) 및 61.96±2.46(p<0.01)µM/mg protein/hr로 줄어 들었다.

4. Vanadate가 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도에 미치는 영향

Vanadate가 basolateral 막의 표지효소인 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도에 미치는 영향은 표 1과 같다. 총 ATPase의 활성도는 incubation medium에 Mg⁺⁺, Na⁺ 및 K⁺이 모두 있을때 이들 이온들에 의하여 활성화되는 ATPase로 하였고 Mg⁺⁺-ATPase는 incubation medium에 10⁻³M ouabain을 첨가하여 Na⁺과 K⁺에 의하여 활성화되는 ATPase를 억제시킨 후 Mg⁺⁺에 의해서만 활성화되는 ATPase로 하였으며 Na⁺, K⁺-ATPase 활성도는 총 ATPase활성도에서 Mg⁺⁺-ATPase활성도를 빼준 값으로 하였다.

표에서 보는 바와 같이 vanadate는 낮은 농도(10⁻⁸M)에서는 Na⁺, K⁺-ATPase활성도를 약간 증가시켰으며 10⁻⁷M이상의 농도에서는 농도에 따라 억제시키는 경향을 보였다. 또한 vanadate는 Na⁺, K⁺-ATPase활성도 만을 선택적으로 억제시키는 것이 아니고 총 ATPase활성도 및 Mg⁺⁺-ATPase 활성도를 모두 억제시켰다.

Table 1. Effects of a various concentration of vanadate on Na⁺, K⁺-ATPase activities of the small intestinal basolateral membranes

| Vanadate Concentration (M) | Total ATPase | Mg ⁺⁺ -ATPase | Na ⁺ , K ⁺ -ATPase |
|----------------------------|---------------|--------------------------|--|
| 0 | 74.00±5.00 | 54.20±3.27 | 19.80±1.90 |
| 10 ⁻⁸ | 72.88±0.61*** | 49.25±0.42*** | 26.05±0.36*** |
| 10 ⁻⁷ | 71.85±4.81 | 53.35±2.88 | 18.51±2.11 |
| 10 ⁻⁶ | 70.38±4.85 | 54.76±3.27 | 15.62±1.75 |
| 10 ⁻⁵ | 66.46±4.51 | 53.44±3.66 | 13.02±1.92** |
| 10 ⁻⁴ | 64.16±5.07 | 49.66±3.48 | 14.50±1.91* |
| 10 ⁻³ | 62.13±2.15** | 46.14±2.12** | 15.99±0.47* |

-ATPase activities are expressed as unit of µmoles Pi/mg protein/hr.

-ATPase values are the means±SE.

*: p<0.1 **: p<0.05 ***: p<0.01 as compared to controls that were preincubated without vanadate.

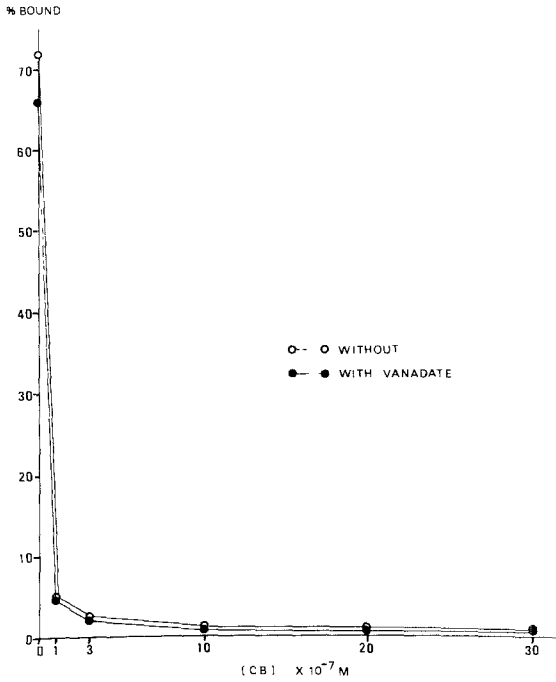


Fig. 3. Effect of vanadate on the cytochalasin B binding activity of brush-border membrane purified from rabbit small intestinal epithelium.

5. Vanadate가 Cytochalasin B 결합에 미치는 영향

Vanadate가 brush-border 막의 cytochalasin B 결합에 미치는 영향은 그림 3에 도시한 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 $10^{-4}M$ vanadate는 cytochalasin B 결합에 거의 영향을 미치지 못하였다. Vanadate가 basolateral막의 cytochalasin B결합에 미치는 영향은 표 2 및 그림 4에 나타내었다. Basolateral 막에는 2종의 cyto-

Table 2. The effect of Vanadate on CB binding to the small intestinal basolateral membranes

| Concentration of CB(M) | CB bound(%) | | |
|------------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
| | without Vanadate | with $10^{-4}M$ Vanadate | with $10^{-3}M$ Vanadate |
| 1.33×10^{-4} | 65.4 | 64.5 | 54.3 |
| 10^{-7} | 34.8 | 32.9 | 28.7 |
| 3×10^{-7} | 26.5 | 26.0 | 23.5 |
| 10^{-6} | 23.6 | 22.6 | 20.9 |
| 2×10^{-6} | 22.1 | 22.1 | 20.2 |
| 3×10^{-6} | 21.0 | 21.5 | 19.8 |

-CB : Cytochalasin B

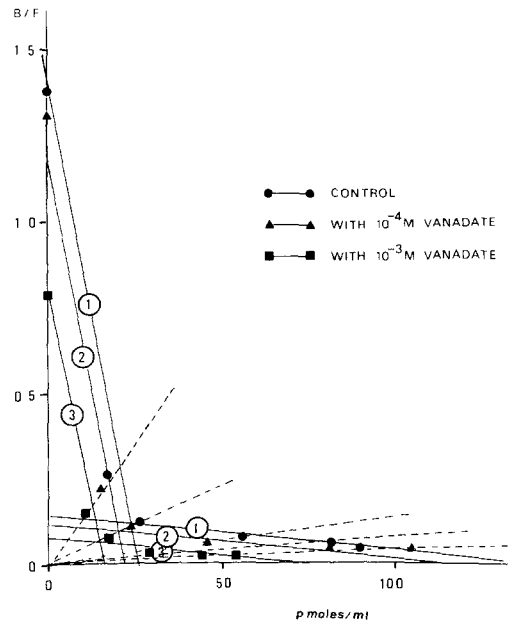
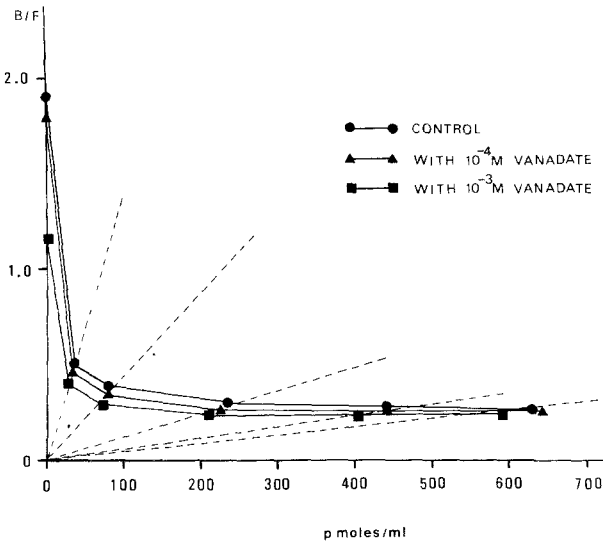


Fig. 4. Scatchard analysis of the cytochalasin B binding data

of basolateral membranes purified from rabbit small intestinal epithelia.

(a) The primary scatchard plot shows at least three components of binding site.

(b) Further scatchard analysis after subtraction of nonspecific binding shows that there are two binding sites at the basolateral membrane. Vanadate reduced cytochalasin B binding at both binding sites.

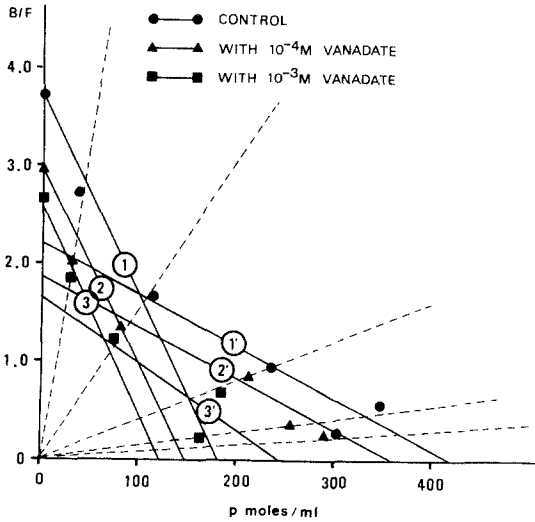


Fig. 5. Scatchard analysis of the cytochalasin B binding data of human erythrocyte ghosts. Freeze-thawed ghost membrane shows there are two cytochalasin B binding sites. Vanadate inhibited cytochalasin B binding at both binding sites.

cytochalasin B 결합부위가 존재하는 것으로 보이며 그 중 하나는 그림 4b의 ①에서 보는 바와 같이 결합능력이 약 26 pmoles/mg protein(dissociation constant= $1.8 \times 10^{-8}M$)이며 다른 하나는 그림 4b의 ②에서 보는 바와 같이 결합능력이 약 140 pmoles/mg protein(dissociation constant= $9.3 \times 10^{-7}M$)였다.

Vanadate는 양쪽부위 모두에서 cytochalasin B결합을 억제시켰는데 $10^{-4}M$ 농도에서는 그림 4b의 ②와 ②'에서 보는 바와 같이 양 부위에서 각각 19.2% 및 21.4%를 억제시켰고 $10^{-3}M$ 농도에서는 그림 4b의 ③과 ③'에서 보는 바와 같이 각각 38.5% 및 45.7% 억제시켰다.

Vanadate가 적혈구막에 있는 cytochalasin B 결합부위에서의 영향은 그림 5에 도시하였다. 대조군에서 cytochalasin B 결합부위는 그림 5의 ① 및 ①'에서 볼 수 있는 바와 같이 120 pmoles/mg protein(단백질 농도: 3.5mg/ml)과 51.4 pmoles/mg protein의 결합능력을 가진 두 부위가 존재 하였으며 vanadate는 이 두 부위 모두에서 Cytochalasin B 결합을 억제하였다. 즉 $10^{-4}M$ vanadate는 그림 5의 ② 및 ②'에서 보는 바와

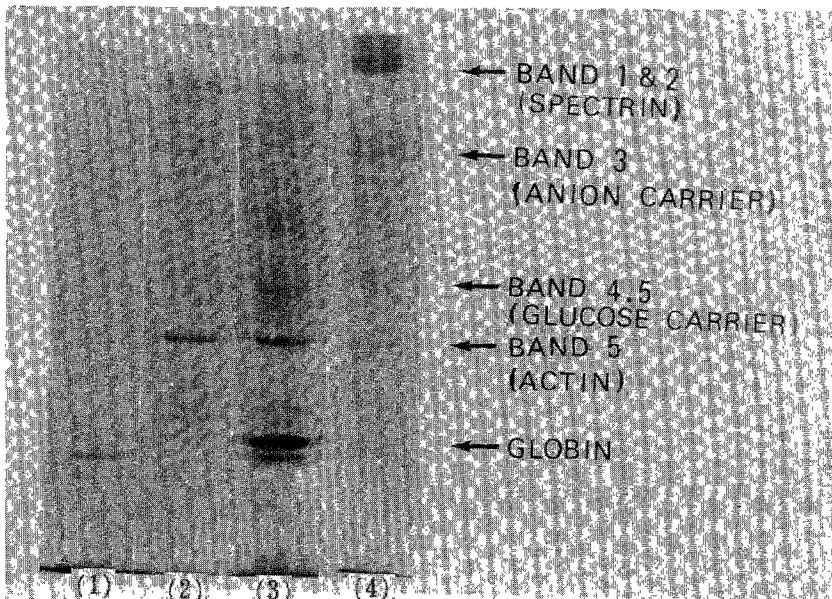
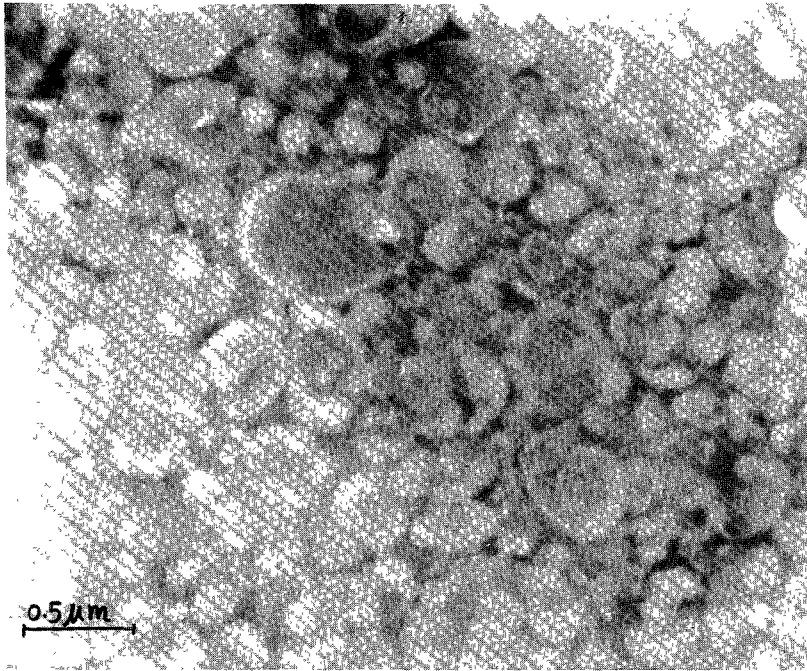
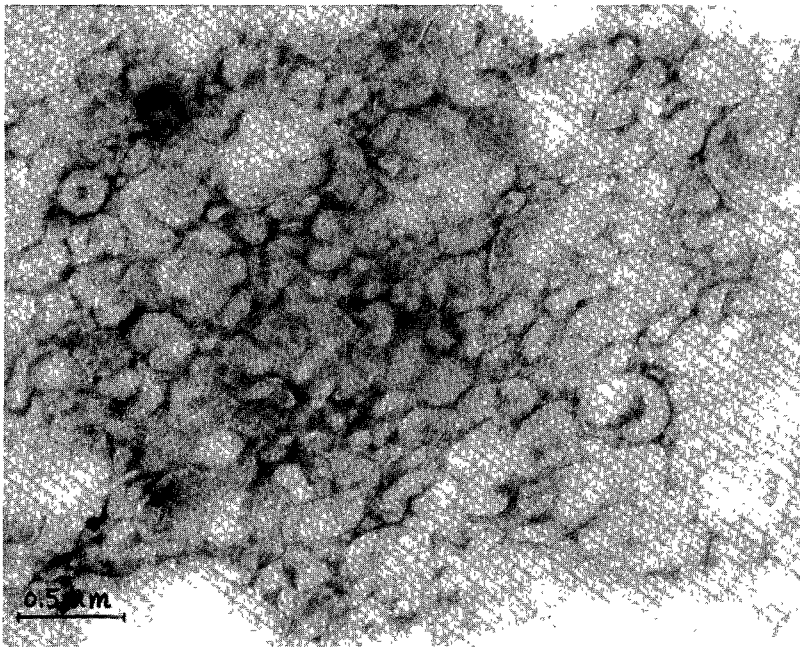


Fig. 6. Gel pictures of the brush-border membrane(2) and basolateral membrane(3) after SDS-gel electrophoresis. (1) & (4) are globin and human erythrocyte ghost membrane as references.

Picture indicates that brush-border and basolateral membranes contain several proteins resembling to actin, anion carrier, spectrin, and glucose carrier of human erythrocyte membrane.



(a)



(b)

Fig. 7. Electron micrographs of negatively stained brush-border membrane vesicles(a) and basolateral membrane vesicles(b).

Negative staining was done with 2% ammonium molybdate for 10 seconds. Magnification $\times 40,000$.

같이 102.8 pmoles/mg protein과 42.8 pmoles/mg protein으로 각각 14.3% 및 16.3% 억제시켰고, $10^{-3}M$ vanadate는 그림 5의 ③ 및 ③'에서 보는 바와 같이 70 pmoles/mg protein과 34.2 pmoles/mg protein으로 각각 42.7% 및 33.5% 억제시켰다. 그러나 Kd는 그림 5의 ①, ② 및 ③에서 약 $4.7\sim 5.0\times 10^{-6}M$ 이었고 ①' ②' 및 ③'에서 $1.5\sim 1.9\times 10^{-7}M$ 로 거의 변화가 없었다.

6. Brush-border 막과 Basolateral 막 단백질의 gel 모양

Brush-border 막과 basolateral 막의 단백질 종류를 관찰하기 위하여 전기영동을 실시한 결과는 그림 6에 나타나 있다. 단백질의 종류를 알아보기 위하여 구성 단백질의 분자량 및 기능이 비교적 잘 알려진 적혈구막 단백질을 참고로 전기영동을 실시하고 분자량의 크기로 비교하였다.

Brush-border막과 basolateral 막은 약 20여종 이상의 단백질이 관찰되었고 상대적으로 많은 양의 actin이 함유되어 있었으며 분자량 약 45,000 dalton의 포도당 운반체 단백질에 해당되는 단백질도 존재하는 것으로 나타났다.

7. Brush-border 막과 Basolateral 막 Vesicle의 전자현미경적 소견

분리 제조된 brush-border 막과 basolateral 막 vesicle을 negative staining을 실시한 후 전자현미경으로 관찰한 결과의 사진은 그림 7에 나타나 있다. 그림에서 보는 바와 같이 brush-border 막과 basolateral 막의 vesicle은 외견상 차이를 볼 수 없었다.

고 찰

Charney등⁴⁾이 sigma회사제품의 adenosin triphosphate(ATP)에 (Na^+ , K^+)-ATPase의 억제물질이 존재하는 것을 처음 보고한 후 Beauge & Glynn¹⁶⁾ 및 Hudgins & Bond¹⁷⁾는 K^+ 이 이 물질의 (Na^+ , K^+)-ATPase 억제작용을 증가시킴을 발견하였으며 Cantley등⁵⁾은 이 물질이 vanadate라는 것을 밝혀냈다. 그 후 vanadate는 신장에서 수분과 Na^+ 의 배설증가¹⁸⁾ 19) 심장의 수축력 증가²⁰⁾ 21) 및 평활근의 수축력 증가¹⁷⁾ 22) 등 많은 생화학적 작용이 있음이 알려져 왔으나 Na^+ 이동과 직접 관련이 있는 소장에서의 포도당 흡수나 적혈구와 같은 조직에서의 포도당 이동에 미치는 영향에

관해서는 확실히 밝혀져 있지 않다.

한편 Crane등²³⁾이 소장의 brush-border 막에서 포도당이 흡수될 때에 Na^+ 과 co-transport한다는 가설을 주장한 이후 지난 20여년간 소장분절을 이용하여 이 가설을 뒷받침하는 많은 연구가 진행되었으며²⁴⁾ 25) in vivo에서 일어날 수 있는 몇가지의 문제들, 이를테면 unstirred layers에 의한 포도당 이동속도에 미치는 영향, 소장상피세포 내로 이동된 포도당의 para-cellular shunts를 통한 유실 및 세포막에서의 포도당의 대사에 의한 유실 등²⁴⁾ 26)으로 인하여 세포막을 통한 정확한 포도당 이동의 동력학적 분석(kinetic analysis)이 이루어지지 못하였으므로 최근에는 소장점막과 장막을 각각 분리하여 만든 membrane vesicles을 이용하여 포도당 이동을 측정하고 있다¹⁾ 27). 즉 Hopfer등²⁸⁾이 처음으로 brush-border membrane의 vesicles을 만들어 Na^+ -glucose transport에 관한 Crane의 가설을 입증하였으며, membrane vesicles을 이용한 물질이동의 측정은 앞서 제시한 intact한 소장절편을 사용했을 때 일어날 수 있는 문제들을 배제할 수 있는 장점 때문에 현재에는 물질이동의 기전을 밝히는 실험에서 주로 membrane vesicles을 만들어 이용하려고 시도하고 있다.

본 실험에서는 먼저 everted sac을 만들어 vanadate를 각 농도별로 첨가하고 한시간동안 incubation한 후 장막(serosa)측과 점막(mucosa)측의 포도당 농도비, 즉 S/M비를 비교하였다. 그림 1에서 본 바와 같이 vanadate는 소장점막을 통한 포도당의 흡수를 억제하였다. 그러나 소장상피세포막은 brush-border 막과 basolateral 막으로 구분되어 있기 때문에 서로 구조와 기능이 다른 두막에서 vanadate가 어떻게 작용하는지를 알 수는 없다. 따라서 방법에서 밝힌 바와 같이 Maenz & Cheeseman⁸⁾의 방법으로 brush-border 막과 basolateral 막을 선택적으로 분리한 후 vanadate가 각 막의 표지효소인 alkaline phosphatase와 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성화도에 미치는 영향을 관찰한 결과 vanadate는 이들 효소의 활성화도를 모두 억제하였다.(Fig. 2 & Table 1). 이 결과는 Hajar등²⁹⁾이 보고한 vanadate의 효과와 일치되는 성적이었다. 따라서 vanadate가 포도당 흡수를 억제하는 기전은 Crane등²³⁾의 가설에 따라 basolateral 막의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도를 감소시킴으로 brush-border 막을 경계로 세포막 내외에 Na^+ 농도차가 줄어들고 이로 인해 Na^+ 의 dri-

ving force가 줄어들어 brush-border 막을 통한 Na^+ -glucose cotransport가 감소하기 때문이라고 설명될 수 있다. 이것은 basolateral 막에서의 포도당 이동이 단순한 확산과정을 전제로 하고 있지만 West²⁾는 basolateral 막에서의 포도당 이동과정은 단순한 확산과정 외에도 포도당운반체 등에 의한 carrier mediated 이동과정도 존재할 것으로 시사하고 있다. 이를 구명하기 위하여 brush-border 막과 basolateral 막에서 vanadate가 cytochalasin B 결합에 미치는 영향을 측정된 결과 그림 3에서 보는바와 같이 brush-border막에는 포도당 운반체로 보이는 glucose sensitive cytochalasin B 결합부위는 없는 것으로 보이며 또한 vanadate의 영향도 거의 없었다. 그러나 basolateral 막에는 affinity constant와 결합능력이 서로 다른 두종의 cytochalasin B 결합단백질이 있고 vanadate에 의해서 cytochalasin B의 결합이 억제되는 것으로 보아(Fig. 4b) 이들이 적혈구막의 포도당운반체¹²⁾와는 약간 성상이 다르긴 하지만 소장에서의 포도당운반체일 가능성이 있다.

한편 포도당운반체로서 그 구조와 기능이 잘 알려진 적혈구막의 cytochalasin B 결합단백질에서 vanadate가 cytochalasin B 결합에 미치는 영향을 직접 측정된 결과(Fig. 5)도 이를 뒷받침해주고 있다. 즉 적혈구의 ghost막에는 cytochalasin B의 결합부위가 세종류 있고¹³⁾ 이중에 site I이 포도당운반체일 것으로 추정되고 있는바, 본실험에 사용된 ghost 막은 얼렸다 녹이는 과정을 되풀이 함으로써 cytochalasin B의 결합부위중 site II가 소실된 것으로 보이나 site I과 site III는 모두 존재하였고 vanadate는 이들 부위 모두에서 cytochalasin B의 결합을 억제하는 것으로 나타났다. 이성적은 적혈구막에서 거의 순수하게 분리한 포도당운반체(band 4.5)에서도 같이 나타났다(성적은 실지 않음). 그래서 basolateral막에도 적혈구막에서와 같이 band 4.5에 해당되는 단백질이 있는지를 관찰하기 위하여 전기영동을 실시하게 되었고 그 결과는 그림 6에서 보는 바와 같이 적혈구막의 band 4.5의 분자량에 해당되는 단백질이 인지되었으며 이는 brush-border 막에도 나타났다. Vanadate에 의해서 cytochalasin B 결합이 영향을 받지 않음에도 불구하고 brush-border 막에 존재하는 이 단백질의 기능이 무엇인지는 이 실험결과로는 확실하게 알 수 없다. 형태학적으로는 brush-border 막과 basolateral 막의 전자현미경적 소

견은 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

결 론

Vanadate(NaVO_3)가 소장 세포막에서 포도당의 이동에 미치는 영향을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Vanadate가 점막의 전체 상피세포를 통한 포도당의 순이동을 측정하기 위하여 everted sac을 만들고 vanadate를 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 포도당의 S/M비를 측정된 결과 vanadate를 투여한 군에서는 투여하지 않은 대조군에 비하여 농도에 따라 S/M비가 감소되었다.

2) Vanadate는 점막의 상피세포로부터 분리한 brush-border 막의 표지효소인 alkaline phosphatase 활성도를 농도에 비례하여 억제시켰으며 basolateral막 표지효소인 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도에 대해서는 10^{-8} M에서는 약간 증가시키고 그 이상의 농도에서는 억제시키는 이중효과를 보였다.

3) Vanadate는 brush-border 막의 cytochalasin B 결합에는 별로 영향을 미치지 못하였으나 basolateral 막의 cytochalasin B 결합은 억제시켰다.

4) Vanadate는 적혈구의 ghost 막과 순수분리된 포도당운반체 단백질(band 4.5)의 cytochalasin B 결합을 억제시켰다.

5) Brush-border 막과 basolateral 막의 전기영동 분석 결과 적혈구막의 포도당운반체에 해당되는 단백질이 인지되었다.

이상의 실험성적을 보아 소장의 상피세포막에서의 포도당 이동은 brush-border 막과 basolateral 막에서 서로 다른 기전에 의해서 일어나며 basolateral 막을 통한 포도당의 이동은 지금까지 밝혀진 단순한 확산 과정에 의해서만 일어나는 것이 아니라 포도당운반체에 의한 carrier mediated 과정도 존재하는 것으로 믿어진다. 따라서 vanadate는 basolateral 막의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도를 억제시킴으로써 brush-border 막을 통한 포도당의 상피세포 내부로의 유입을 억제할 뿐 아니라 basolateral 막에 존재하는 포도당운반체 단백질에 직접 작용하여 이 단백질의 기능을 억제시킴으로써 포도당 이동 기능을 억제시키는 것으로 생각된다.

References

- 1) Stevens BR, Jonathan DK, and Wright EM : *Intestinal Transport of amino acids and sugars. Advantages using membrane vesicles. Ann Rev Physiol* 1984 : 46 : 417-433
- 2) West JB : *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical practice 11th ed., Williams & Wilkins, Baltimore/London, 1985 : pp757-758*
- 3) Semenza G, Kessler M, Hosang M, Weber J, and Schmidt U : *Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small intestinal brush-border membrane. Biochim Biophys Acta* 1984 : 779 : 343-379
- 4) Charney AN, Silva P, and Epstein FH : *An in vitro inhibitor of Na-K-ATPase present in an adenosine triphosphate preparation. J Appl Physiol* 1975 : 39 : 156-158
- 5) Cantley LC, Josephson L, Warner R, Yanagisawa M, Lechene C, and Guidotti G : *Vanadate is a potent (Na⁺, K⁺)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J Biol Chem* 1977 : 252 : 7421-7423
- 6) Wiseman G : *Absorption of amino acids. Handbook of Physiology. Sec. 6. Alimentary canal. Vol. III (Code, C.F. ed). American Physiological Society, 1968*
- 7) Hawk PB, Oser BL, and Summerson WH : *Practical Physiological Chemistry (13th ed.) McGraw-Hill Book Co. Inc. 1954 : pp568-570*
- 8) Maenz DD, Cheeseman CI : *Effect of hyperglycemia on D-glucose transport across the brush-border and basolateral membrane of rat small intestine. Biochim Biophys Acta* 1986 : 860 : 277-285
- 9) Scaleria V, Storelli C, Storelli-Joss C, Haase W, Murer : *A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. Biochem J* 1980 : 186 : 177-181
- 10) Parkinson DK, Ebel H, Dibona DR, Sharp GWG : *Localization of the action of Cholera toxin on adenyl cyclase in mucosal epithelial cells of rabbit intestine. J Clin Invest* 1972 : 51 : 2292-2298
- 11) Jung CY, and Rampal AL : *Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. J Biol Chem* 1977 : 252 : 5456-5463
- 12) Hah JS : *The effects of physical states of phospholipids on the incorporation and CB binding activity of band 4, 5 protein of human erythrocyte membrane in reconstituted vesicles. Ewha Med J* 1986 : 9 : 163-173
- 13) Laemmli UK : *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 1970 : 227 : 680-685
- 14) Hah JS, Hui SW, Jung CY : *Effects of physical states of phospholipids on the incorporation and cytochalasin B binding activity of human erythrocyte membrane proteins in reconstituted vesicles. Biochemistry* 1983 : 22 : 4763-4769
- 15) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 : 193 : 265-275
- 16) Beauge L, and Glynn IM : *A modifier of (Na⁺, K⁺)-ATPase in commercial ATP. Nature(London)* 1977 : 268 : 355-356
- 17) Hudgins PM, and Bond GH : *(Mg⁺⁺, K⁺)-dependent inhibition of (Na⁺, K⁺)-ATPase due to a contaminant in equine muscle ATP. Biochem Biophys Res Commun* 1977 : 77 : 1024-1029
- 18) Balfour WE, Grantham JJ, and Glynn IM : *Vanadate-stimulated natriuresis in the rat. Nature(London)* 1978 : 275 : 768
- 19) Westenfelder O, Hamburger RK, and Garcia ME : *Effect of vanadate on renal tubular function in rats. Am J Physiol* 1981 : 240 : F522
- 20) Hackbarth I, Schmit W, Scholz H, Erdmann E, Krawitz W, and Philipp G : *Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle. Nature(London)* 1978 : 275 : 67
- 21) Takeda K, Temma K, and Akera T : *Inotropic effects of vanadate in isolated rat and guinea pig heart under conditions which modify calcium pools involved in contractile activation. J Pharmacol Exp Ther* 1982 : 222 : 132-137
- 22) Ozaki H, Ueda F, and Urakawa N : *Inhibitory effects of vanadate on the contractile response in vascular smooth muscle. Eur J Pharmacol* 1980 : 80 : 317-321
- 23) Crane RK, Miller D, and Bihler I : *Membrane Trans-*

- port and Metabolism* (Kleinzeller and Totyk ed). Academic Press, New York. 1961 : pp439-449
- 24) Kimmich GA : *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Johnson, L.R. ed) Ch. 41, Raven Press, New York, 1981 : pp1035-1061
- 25) Crane RK : *Selected Topics in the History of Biochemistry. Comprehensive Biochemistry, Vol 35*(Semenza, G. ed), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983 : pp 43-69
- 26) Munck BG : *Intestinal absorption of amino acids. Physiology of the Gastrointestinal Tract*(Johnson, L.R. ed) Ravan Press, New York, 1981 : pp1097-1122
- 27) Murer H, and Kinne R : *The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes. J Memb Biol* 1980 : 55 : 81-95
- 28) Hopfer U, Nelson K, Perotto J, and Isselbacher KJ : *Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. J Biol Chem* 1973 : 248 : 25-32
- 29) Hajjar JJ, Fucci JC, Rowe WA, Tomicic TK : *Effect of vanadate on amino acid transport in rat jejunum. Proc Soc Exp Biol Med* 1987 : 184 : 403-409