

밀리포아 필터에서의 헤모글로빈에 의한 산소의 촉진전달

황 순 옥*·임 선 기

한국과학기술원 화학공학과

*제일제당(주) 식품연구소

(1982년 5월 24일 접수)

Facilitated Transport of Oxygen by Hemoglobin through Millipore Filter

Soon-Ook Hwang,* and Son-Ki Ihm

Department of Chemical Engineering,

Korea Advanced Institute of Science and Technology,

P.O. Box 150, Chongyangni Seoul 131, Korea

**Food Research Laboratory, Cheil Sugar Co., Ltd.*

(Received; May 24, 1982)

요 약

헤모글로빈 용액으로 적셔진 밀리포아 필터를 통한 산소의 확산실험을 행하였다. 메테모글로빈 용액으로 적셔진 밀리포아 필터를 통해 산소가 확산되는 경우에는 Fick의 확산법칙을 따르는 현상을 보이나, 헤모글로빈 막을 통한 경우에는 확산량이 이보다 일정량만큼 증가하였다. 따라서 augmenting chemical reaction model을 사용하여 현상을 규명하였다. 메테모글로빈 막을 통한 확산실험에서 산소의 확산계수를 구할 수 있었고, 한편 헤모글로빈 막을 통한 확산실험에서 헤모글로빈의 확산계수를 구할 수 있었는데 실험에서 구한 확산계수를 사용하여 이론식에 적용하여 촉진확산속도를 구하였다. 이 값과 실험값이 근사함을 보였고, 따라서 헤모글로빈막을 통한 산소의 확산속도는 옥시헤모글로빈의 농도구배에 의해 촉진확산속도만큼 증가한다는 것을 알 수 있었다.

ABSTRACT

Experimental study has been made on the oxygen transport through a Millipore filter containing hemoglobin solution. Diffusivity of oxygen was obtained from the permeation through the filter containing methemoglobin solution, instead of hemoglobin, which does not interact

with oxygen and therefore does not facilitate the diffusion. On the other hand, the diffusivity of hemoglobin was estimated by the augmenting chemical reaction model which was found in a good correlation with the experimental data. Accordingly confirmation can be made on the assumption that the facilitation of oxygen is attributed to transport of oxyhemoglobin due to its concentration gradient.

1. 서 론

헤모글로빈에 의한 산소의 촉진전달(facilitated transport)은 막을 지나는 산소가 막의 두 면 사이에서 움직이는 헤모글로빈과 가역적으로 반응하여 전달이 증진되는 과정이다. 산소가 막으로 직접 들어가서 막내에서 자유로이 움직일 수 있는 헤모글로빈과 가역적으로 결합하여 옥시헤모글로빈을 형성하며 산소는 옥시헤모글로빈의 형태와 산소 그 자체로서 막내에서 움직인다.

Fig. 1¹⁾에서 보는 바와 같이 $x=0$ 에서 옥시헤모글로빈이 형성되고 막의 중앙에서는 거의 같은 정도의 옥시헤모글로빈의 형성과 분해가 있고 $x=L$ 에서는 옥시헤모글로빈이 분해되어 산소가 막을 떠난다.

이 과정을 설명하기 위해 제안된 메카니즘은 다음과 같다.

(1) carrier model²⁾에서는 막 내에서 헤모글

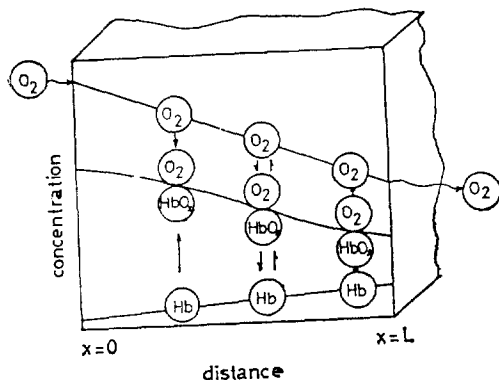


Fig. 1. Conceptual Model for the Mechanism of O_2 Transport

로빈이 산소를 전달하는데 있어 두 계면 사이에서 좌우로 움직인다고 가정하는데 산소 한 분자가 한 개의 헤모글로빈 분자와 결합한 다음 인접한 헤모글로빈 분자에 연속적으로 전달된다.

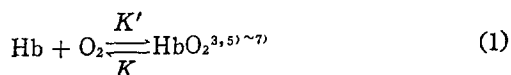
따라서 헤모글로빈 분자 수가 증가할수록 촉진확산속도는 증가한다고 볼 수 있다. 이때는 촉진확산속도가 헤모글로빈 농도의 제곱에 비례하는 것으로 알려져 있으나³⁾ 본실험결과와는 일치하지 않아 모델로서는 적합하지 않았다.

(2) augmenting chemical reaction model⁴⁾에서는 막 내에서 반응이 일어나 생성물인 옥시헤모글로빈이 확산과정에 참여한다고 가정한다. 옥시헤모글로빈이 농도구배에 의하여 막의 반대 계면에 도달하면 헤모글로빈과 산소로 분해되어 산소가 막 밖으로 나가게 된다. 따라서 산소의 총 전달속도는 산소와 옥시헤모글로빈의 확산속도의 합이므로 산소의 전달속도는 옥시헤모글로빈의 확산속도만큼 증가된다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 헤모글로빈 용액으로 채워진 밀리포아 필터로 만들어진 단순막에서 산소의 정상상태에서의 확산실험을 행하였으며 헤모글로빈 농도와 산소의 분압을 실험변수로 하여 산소와 헤모글로빈의 반응에 따른 산소의 확산속도의 변화를 augmenting chemical reaction model에 의하여 설명하고자 한다.

2. 이론적 설명

인체의 헤모글로빈 A와 산소의 반응은



이므로 이에 대한 물질수지식을 액막에서 세우

면 다음과 같다.

$$D_{O_2} \frac{\partial^2 [O_2]}{\partial x^2} = \frac{\partial [O_2]}{\partial t} + K' [Hb] [O_2] - K [HbO_2] \quad (2)$$

$$D_{HbO_2} \frac{\partial^2 [HbO_2]}{\partial x^2} = \frac{\partial [HbO_2]}{\partial t} + K [HbO_2] - K' [Hb] [O_2] \quad (3)$$

$$D_{Hb} \frac{\partial^2 [Hb]}{\partial x^2} = \frac{\partial [Hb]}{\partial t} + K' [Hb] [O_2] - K [HbO_2] \quad (4)$$

정상상태인 경우

$$D_{O_2} \frac{d[O_2]}{dx} + D_{HbO_2} \frac{d[HbO_2]}{dx} = -F^{st} \quad (5)$$

가 되며, F 는 정상상태에서의 산소의 flux이며 식 (5)의 왼편 첫째항은 단순한 Fick의 확산이고, 둘째항은 옥시헤모글로빈에 의한 산소의 촉진확산을 나타내고 있다.

막의 양쪽면에서 Henry의 법칙이 성립한다고 보면

$$[O_2]_{x=0} = \gamma P_0 \quad (6)$$

$$[O_2]_{x=L} = \gamma P_L \quad (7)$$

한편 옥시헤모글로빈은 막의 밖으로 나올 수

없으므로

$$\left(\frac{d[HbO_2]}{dx} \right)_{x=0} = 0 \quad (8)$$

$$\left(\frac{d[HbO_2]}{dx} \right)_{x=L} = 0 \quad (9)$$

이 식들을 풀기 위해서 Kreuzer 및 Hoofd가 사용한 막의 제면 근처에서의 경계층 가정을 도입하여 정리하면 다음과 같이 된다. 산소의 확산플럭스(flux)는 다음 식과 같다.

$$F = \frac{D_{O_2} \gamma (P_0 - P_L)}{L} + \frac{D_{Hb} ([HbO_2]_{x=0} - [HbO_2]_{x=L})}{L} \quad (10)$$

그리고 막의 제면에서의 옥시헤모글로빈의 농도는

$$[HbO_2]_{x=0} = \frac{K' [RO] (\gamma P_0 - E)}{K + K' (\gamma P_0 - E)} - \frac{D_{O_2} E}{D_{Hb}} \quad (11)$$

$$[HbO_2]_{x=L} = \frac{K' [RO] (\gamma P_L + H)}{K + K' (\gamma P_L + H)} + \frac{D_{O_2} H}{D_{Hb}} \quad (12)$$

여기서

$$E = \frac{F}{\alpha D_{O_2} \left\{ 1 + \frac{D_{O_2} (K + K' \gamma P_0 - K' E)^2}{D_{Hb} K K' [RO]} \right\}} \quad (13)$$

$$H = \frac{F}{\beta D_{O_2} \left\{ 1 + \frac{D_{O_2} (K + K' \gamma P_L + K' H)^2}{D_{Hb} K K' [RO]} \right\}} \quad (14)$$

$$\alpha = \sqrt{K' [Hb]_{x=0} / D_{O_2} + K / D_{Hb}} \quad (15)$$

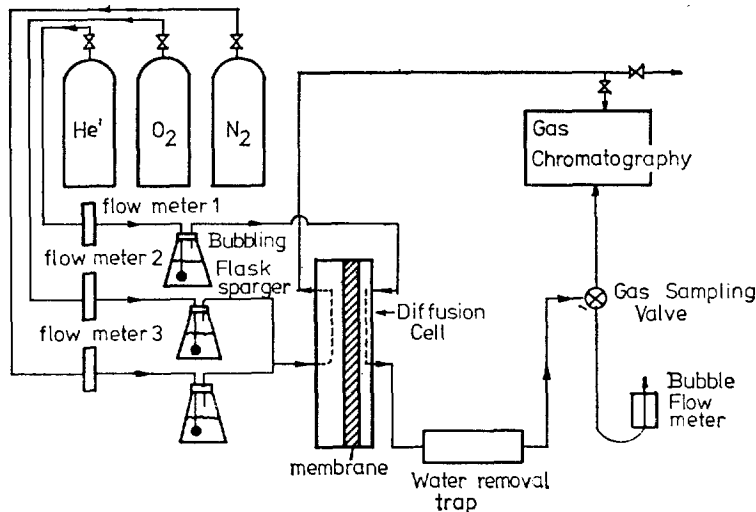


Fig. 2. Schematic Flow Diagram for Diffusion Measurements

$$\beta = \sqrt{K'[\text{Hb}]_{x=L}/D_{O_2} + K/D_{\text{Hb}}} \quad (16)$$

3. 실험

실험에 사용한 헤모글로빈 용액은 서울 적십자 병원에서 구입한 A형의 혈액으로 만들었으며, 헤모글로빈 용액 제조에 사용한 완충용액은 Clark and Lubs⁹⁾ 용액인데 pH를 7.4로 조절하여 사용하였다.

헤모글로빈 용액의 농도측정은 시안메테모글로빈법¹⁰⁾을 사용하였으며 검량선은 시안메테모글로빈 표준액(Stock NO, 525-18, Hemoglobin standard, sigma)을 사용하여 분광광도계(Spectronic-20, Bausch & Rohm)로 측정하여 준비하였다. 메테모글로빈 용액은 헤모글로빈 용액에 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 를 가하여 만들었다. 헤모글로빈 용액과 메테모글로빈 용액에 밀리포아 필터를 적셔 액막을 만들어 확산 cell에 끼웠으며 확산 cell을 항온조에 담기게 하여 cell의 온도를 22.5°C에서 일정하게 유지하였고 질소와 산소를 상류로 일정한 분압으로 보내는 한편 하류로는 헬륨을 보내 막을 통해 나오는 질소와 산소의 양을 가스 크로마토그래피로 측정하였다(Fig. 2 참조).

실험에 사용한 확산 cell의 확산면적은 28.27

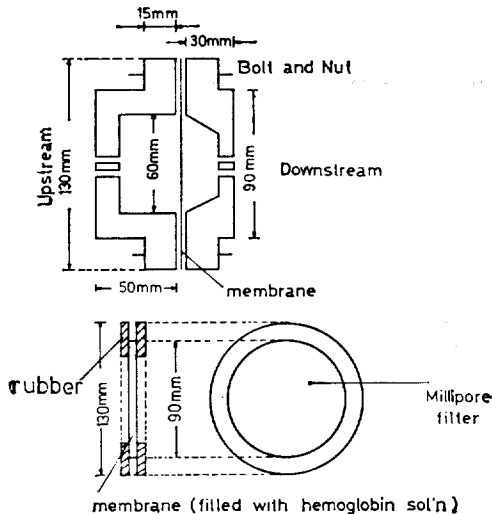


Fig. 3. Schematic Diagram of Diffusion Cell

cm^2 이었다(Fig. 3 참조). 상류 cell의 부피는 약 99 cm^3 이고 하류 cell의 부피는 약 24 cm^3 이었으며 가스 크로마토그래피에 사용한 column은 1/8" × 3m인 동관에 Molecular Sieve 5A를 충전시킨 것이었다.

4. 결과 및 고찰

메테모글로빈 막을 통한 산소의 단순확산속도는 상류와 하류압력의 차이 Δp 에 비례하므로 Δp 에 따라 속도를 plot 하면 Δp 가 영일 경우 속도가 영이 되는 선형 profile을 보이고 있다(Fig. 4 참조).

한편 헤모글로빈 막에서의 산소의 확산속도는 메테모글로빈 막에서의 단순확산속도보다 일정한 양이 증가한 선형 profile을 보인다(Fig. 5, 6, 7 참조).

다음에 각 실험변수가 미치는 영향을 살펴보기로 한다.¹¹⁾

4-1. 압력의 영향

상류압력이 일정값 이상이 되면 상류쪽의 막의 계면에서 헤모글로빈은 포화되어 완전히 옥시헤모글로빈으로 바뀌는데 헤모글로빈의 포화에 필요한 산소압력은 120 mmHg이다.¹²⁾ 따라서 산소의 압력이 이 이상이 되면 촉진확산속도의 변화에 영향을 미치지 못한다.

본 실험에서는 상류압력을 120 mmHg 이상으로 조절하여 촉진확산속도의 변화에 대한 영향을 없게 하여 점차 압력을 증가시켜 실험을 행하였으며 주어진 헤모글로빈의 농도에 대하여 촉진확산속도가 일정하다고 볼 수 있었다.^{13, 14)}

4-2. 메테모글로빈과 헤모글로빈의 농도에 따른 영향

헤모글로빈 막을 통한 산소의 확산은 단순확산과 촉진확산의 합이므로, 헤모글로빈 농도가 이들에 미치는 영향을 알아볼 필요가 있다.

먼저 단순확산에 대한 영향을 알아보기 위하여 메테모글로빈 막을 사용한 경우 메테모글로빈 농도가 증가하면 산소의 단순확산량이 감소하

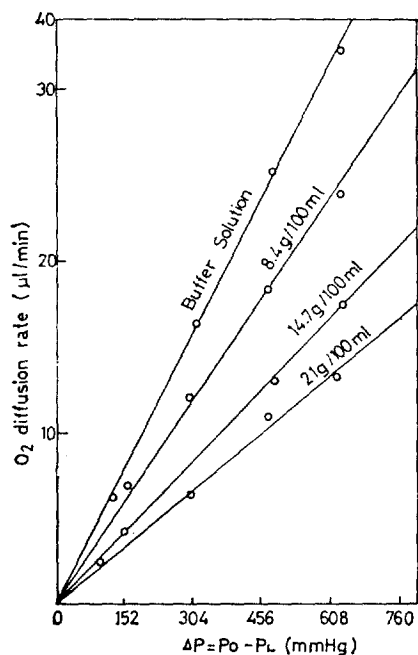


Fig. 4. Simple Diffusion of Oxygen through Methemoglobin Membrane

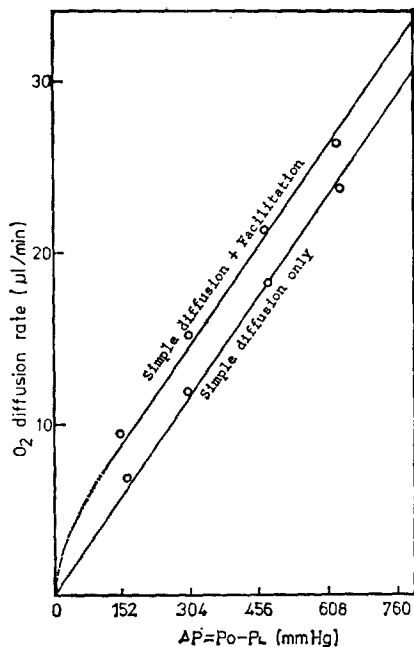


Fig. 5. Oxygen Diffusion at Hemoglobin Concentration of 8.4 g/100ml

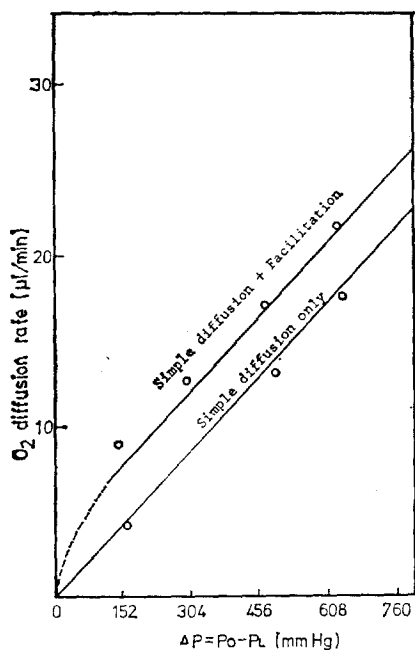


Fig. 6. Oxygen Diffusion of Hemoglobin Concentration of 14.7 g/100ml

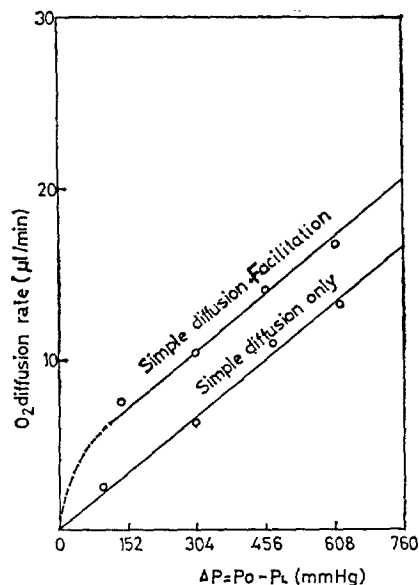


Fig. 7. Oxygen Diffusion at Hemoglobin Concentration of 21 g/100ml

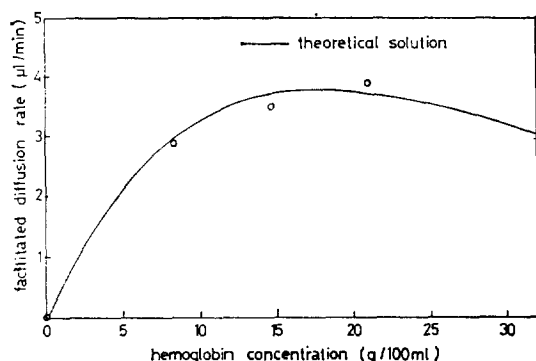


Fig. 8. Facilitated Diffusion Rate by Hemoglobin and Concentration Effect

였다(Fig. 4 참조).

이는 헤모글로빈 농도가 증가함에 따라 단순 확산량도 감소한다는 것을 의미하며, 또한 헤모글로빈 농도가 촉진확산속도에 미치는 영향을 알려면 헤모글로빈 막을 통한 산소의 확산속도에서 단순확산속도를 빼주면 된다. Fig. 8에서 보듯이 헤모글로빈 농도가 약 20 g/100ml 까지 증가하면 촉진확산속도도 증가함을 알 수 있다. 뒤에 설명되겠지만, 이 증가추세는 최대값을 보이고 다시 감소하게 된다.

4-3. 헤모글로빈 농도에 따른 확산계수

$$(10) \text{식중 첫번째항인 } J = \frac{D_{O_2} \gamma (P_0 - P_L)}{L}$$

에 메테모글로빈 막을 통한 산소의 단순확산속도, P_0 및 P_L 의 실험값, 막두께인 150 μm 를 대입하면 각 농도에서의 산소의 확산계수를 구할 수 있고, 메테모글로빈 용액을 통한 산소의 단순확산속도와 헤모글로빈 용액을 통한 산소의 단순확산속도는 같다고 볼 수 있다. 따라서 산소의 확산계수와 헤모글로빈 농도와의 관계식은 다음과 같이 주어진다.

$$D_{O_2} = 1.26 \times 10^{-5} - 0.55[\text{RO}], \text{ cm}^2/\text{sec}$$

헤모글로빈 분자의 크기는 산소분자보다 훨씬 크므로 옥시헤모글로빈 분자의 크기와 거의 같다고 볼 수 있다. 따라서 옥시헤모글로빈의 확산계수는 헤모글로빈의 확산계수와 같다고 가정된다.

(10)식의 두번째 항에 나타나는 옥시헤모글로빈의 확산계수 즉 헤모글로빈의 확산계수는 이론식에서 구할 수 있는데 (10), (11), (12)식에서 E 및 H의 영향은 무시할만 하므로^{4,13)}

$$F = \frac{D_{O_2} \gamma (P_0 - P_L)}{L} - \frac{D_{Hb} [\text{RO}]}{L} \times \left(\frac{K' \gamma P_0}{K + K' \gamma P_0} - \frac{K' \gamma P_L}{K + K' \gamma P_L} \right)$$

이 되고 이 식은 반응이 막내의 각 지점에서 평형에 있을 때의 식¹⁴⁾이다. 실제로 산소와 헤모글로빈의 반응은 매우 빠르므로 반응이 막 내에서 평형에 있다고 간주해도 된다. 얻어진 헤모글로빈의 확산계수는 다음과 같다.

$$D_{Hb} = e^{(-14.7 - 8.69 \times 10^4 [\text{RO}])}, \text{ cm}^2/\text{sec}$$

이와 같이 얻어진 산소 및 (옥시)헤모글로빈의 확산계수를 사용하여 헤모글로빈 농도에 따른 촉진확산속도의 실험결과를 cuive fitting 한 것이 Fig. 8에 또한 표시되어 있다. 촉진확산속도가 헤모글로빈 농도가 20g/100ml 부근에서 최대값을 가지고 그 이후에는 감소함을 알 수 있는데, 이는 헤모글로빈의 농도가 그 이상 증가하면 담체(carrer)의 역할보다는 산소의 확산에 장애 역할을 하기 때문이다.

4-4. D_{O_2} 및 D_{Hb} 의 검토

산소의 확산계수와 헤모글로빈 농도와의 관계식을 data¹⁵⁾에서 correlation하여 구하였는데 이는 다음과 같다.

Keller의 data¹⁶⁾를 식으로 나타내면

$$D_{O_2} = 1.69 \times 10^{-5} - 0.685[\text{RO}]$$

이고, Kreuzer 등의 계산 data^{4,15)}를 수식화하면

$$D_{O_2} = 2.07 \times 10^{-5} - 0.685[\text{RO}]$$

이며, 본 실험에서 구한 관계식은

$$D_{O_2} = 1.26 \times 10^{-5} - 0.55[\text{RO}]$$

이다. 한편 Keller와 Friedländer¹⁷⁾의 data를 correlation하여 구한 헤모글로빈의 확산계수와 헤모글로빈 농도와의 관계식은 다음과 같다.

$$D_{Hb} = e^{(-13.8 - 1.24 \times 10^5 [\text{RO}])}$$

Moll의 data¹⁸⁾를 식으로 표시하면

$$D_{Hb} = e^{(-14.7 - 1.29 \times 10^5 [\text{RO}])}$$

이고 본 실험에서 구한 관계식은

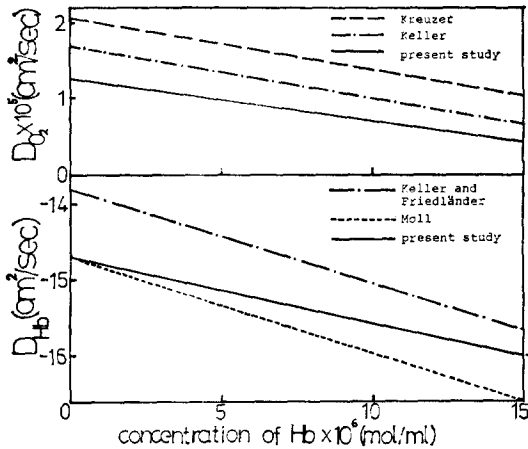


Fig. 9. Diffusivities of Oxygen and Hemoglobin in Hemoglobin Solution at 22.5°C

$$D_{Hb} = e^{(-14-8.69 \times 10^4 [RO])}$$

이다. 이들을 헤모글로빈의 농도에 따라 plot 한 것이 Fig. 9에 나타나 있다. 이들을 비교하면 본 실험에서 구한 관계식들과 서로 같은 차수범위(order of magnitude)에 있음을 알 수 있다.

5. 결 론

(1) 메테모글로빈 용액으로 적셔진 밀리포아 필터를 통한 산소의 단순확산속도를 측정하여 구한 메테모글로빈 또는 헤모글로빈 농도 $[RO]$ (mol/ml)에 따른 산소의 확산계수 D_{O_2} 의 관계식은 다음과 같이 주어진다.

$$D_{O_2} = 1.26 \times 10^{-5} - 0.55[RO] (\text{cm}^2/\text{sec})$$

한편 헤모글로빈 용액으로 적셔진 밀리포아 필터를 통한 산소의 촉진확산속도로부터 각 헤모글로빈 농도(mol/ml)에 따른 헤모글로빈의 확산계수의 관계식은 다음과 같이 얻어졌다.

$$D_{Hb} = e^{(-14.7-8.69 \times 10^4 [RO])} (\text{cm}^2/\text{sec})$$

(2) 위에서 얻어진 산소 및 헤모글로빈의 확산계수를 augmenting chemical reaction model에 대입하여 실험결과와 비교했을때 매우 근사함을 보여 주었고, 따라서 산소의 촉진확산속도는 헤모글로빈의 산화물인 옥시헤모글로빈의 농도구배에 의한 것이라는 것을 확인하였다.

Nomenclature

- D_{Hb} diffusivity of hemoglobin in hemoglobin solution, cm^2/sec
- D_{HbO_2} diffusivity of oxyhemoglobin in hemoglobin solution, cm^2/sec
- D_{O_2} diffusivity of oxygen in hemoglobin solution, cm^2/sec
- E deviation in oxygen concentration from equilibrium at upstream, mol/ml
- F total flux of oxygen, $\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ sec}$
- H deviation in oxygen concentration from equilibrium at downstream, mol/ml
- Hb hemoglobin
- $[Hb]$ concentration of hemoglobin, mol/ml
- $[Hb]_{x=L}$ concentration of hemoglobin at $x = L$, mol/ml
- $[Hb]_{x=0}$ concentration of hemoglobin at $x = 0$, mol/ml
- HbO_2 oxyhemoglobin
- $[HbO_2]$ concentration of oxyhemoglobin, mol/ml
- $[HbO_2]_{x=L}$ concentration of oxyhemoglobin at $x = L$, mol/ml
- $[HbO_2]_{x=0}$ concentration of oxyhemoglobin at $x = 0$, mol/ml
- J simple diffusive flux of oxygen, $\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ sec}$
- K dissociation constant, $40 \text{ sec}^{-1 19)}$
- K' association constant, $3 \times 10^8 \text{ ml}/\text{mol} \text{ sec}^{19)}$
- L diffusion length, cm
- O_2 oxygen
- $[O_2]$ concentration of oxygen, mol/ml
- $[O_2]_{x=L}$ concentration of oxygen at $x = L$, mol/ml
- $[O_2]_{x=0}$ concentration of oxygen at $x = 0$, mol/ml
- P_L pressure of oxygen in downstream, mmHg
- P_0 pressure of oxygen in upstream, mmHg
- $[RO]$ total Hb concentration (monomeric), mol/ml

| | |
|------------|---|
| t | time, sec |
| x | distance in membrane between O and L Greek Symbols |
| α | expression according to (15) |
| β | expression according to (16) |
| γ | solubility of $O_2 = 1.51 \times 10^{-3}$ mol/ml mmHg ²⁰ |
| Δp | oxygen pressure difference between upstream and downstream |

참 고 문 헌

1. J.S. Schultz, AICHE J., 20(1974), 417.
2. P.F. Scholander, Science, 131(1960), 585.
3. J.B. Wittenberg, The J. of Biological chemistry, 241(1966), 104.
4. F. Kreuzer and L.J.C. Hoofd, Respir. physiol., 8(1970), 280.
5. M. Weissbluth, "Hemoglobin," Springer-Vaerlag, Berlin, (1974).
6. Q.H. Gibson, Progr. Biophys. Chem., 9 (1959), 1.
7. F.W. Sunderman and F.W. Jr., "Hemoglobin its Precursors and Metabolites," J.B. Lippincott Co., U.S.A., (1964).
8. W.J. Ward, AICHE J., 16(1970), 405.
9. R.M.C. Dawson and D.C. Elliott, "Data for Biochemical Research", 2nd eds, Oxford University press, (1969). p.490.
10. 강득용, 박찬걸, "혈액학", 수문사 (1979).
11. F. Kreuzer and L.J.C. Hoofd, Respir. Physiol., 15(1972), 104.
12. C. Tanford, "Physical Chemistry of Macromolecules," University of Tokyo Press, (1969), p.530.
13. S.O. Hwang, MS Thesis, Korea Advanced Inst. Sci. Tech., (1981).
14. C.K. Colton, P. Stroeve and J.G. Zahka, J.Appl. Physiol., 35(1973), 307.
15. F. Kreuzer, Respir. Physiol., 9(1970), 1.
16. K.H. Keller, Ph.D. Thesis, Johns Hopkins University, Baltimore, (1964).
17. K.H. Keller and S.K. Friedlander, J. Gen. Physiol., 49(1966), 663.
18. W. Moll, Respir. Physiol., 1(1966), 357.
19. J.A. Jacquez, H. Kutchai, and E. Daniels, Respir. Physiol., 15(1972), 166.
20. J. Sendroy, Jr., R.T. Dillon, and D.D. Van Slyke, J. Biol. Chem., 105(1934), 597.