

백서 뇌 피질 Homogenate 내 ATPase 활성도에 미치는 수중 최면제 및 안정제의 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

<지도 李 相 鎬 부교수>

李 亮 熙 · 韓 東 大 · 鄭 演 九 · 黃 東 洙

=Abstract=

Effects of Various Hypnotic and Tranquilizer on the Homogenate ATPase Activity of the Rat Brain Cortex

Yang Hee Lee, M.D., Dong Dae Han, M.D., Young Koo Chung, M.D. and Dong Soo Hwang, M.D.

Department of Physiology, Pusan National University School of Medicine

(Director: Assoc. Prof. Sang Ho Lee, M.D.)

The activity of Mg and Na-K activated ATPase of homogenate from rat brain cortex was measured in vitro under the variety of conditions.

The effects of various hypnotic and tranquilizer such as phenobarbital, amobarbital, diazepam, promazine and chlorpromazine on the activities of both ATPase was investigated and the results was summarized as follows.

1. Na-K ATPase was slightly inhibited by phenobarbital and amobarbital while Mg ATPase was moderately activated by these drugs.
2. Both Mg and Na-K ATPase activities were markedly inhibited by diazepam.
3. Promazine and chlorpromazine markedly inhibited both Mg and Na-K ATPase activities.

These findings indicate that remarkable correlation between hypnotic or tranquilizing potency and ATPase inhibition could be observed.

서 론

생체 세포막에서 K⁺은 세포막 안으로 Na⁺은 밖으로 능동적으로 이동시키고 있다 함은 잘 알고있는 사실이다(Glynn 1957, Hoffmann 1960). 그리고 세포막을 통한 이러한 양 이온의 능동적인 이동에 밀접한 관련이 있는 Na⁺-K⁺에 의하여 활성화되는 adenosine-triphosphatase (ATPase)의 역할도 잘 알려져 있다 (Post et al. 1960, Järnefelt 1962, Glynn 1964, Skou 1965).

한편 Judah and Ahmed (1964)와 Davis and Brody (1966) 및 김(1972)은 중추신경 억제제가 이 ATPase 효소계를 억제한다고 하였으며, chlorpromazine의 안정

제 작용은 ATPase 활성도의 억제작용과 관련이 있는것 같다고 암시하였다(Davis and Brody 1966).

그래서 저자들은 최면제 및 안정제의 작용기전을 추구하고저 최면제인 phenobarbital과 amobarbital, 미약한 안정제인 diazepam, 그리고 강력한 안정제인 promazine과 chlorpromazine 등 약물이 백서 뇌 피질 homogenate 내 Mg ATPase와 Na-K ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰하고자 이 실험을 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물 : 체중 170 g 내외의 성숙한 백서를 사용하였다.

Table 1. The effect of varying amount of protein on Na-K ATPase activity

Tube No.	1	2	3	4	5	F.C. (mM)
50 mM T-HCl buffer (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	10
15 mM MgCl ₂ (//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.5
100 mM KCl (//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	10
1 M NaCl (//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100
15 mM ATP (//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.5
1 mM EDTA (//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Protein in homogenate, 10 mg/ml protein (//)	0.025	0.05	0.075	0.10	0.125	—
Distilled water (//)	0.275	0.25	0.225	0.20	0.175	—
Pi (μM)	8.9	15.7	22.3	29.2	36.5	

T-HCl buffer; Tris-HCl buffer

Pi; Inorganic phosphate

F.C.; Final concentration

뇌 조직 homogenate의 분리: 경동맥을 절단하여 출혈사를 일으킨 후, 뇌를 적출하여 백질을 제거한 뇌피질조직을 Taylor(1963) 방법으로 homogenate를 만들었다. 즉 3g의 뇌 조직을 냉각한 용액(250 mM sucrose, 5 mM EDTA, 30 mM histidine-Cl (pH 6.8), 0.1% sodium deoxycholate)으로 두번 세척한 다음, 위의 용액을 가해서 Waring blender로 1분간 homogenize 하여 10% homogenate를 만든 다음, 이 homogenate를 원심침전관에 분주하여 냉동침전기내에서 850×g로 10분간 원심침전한 다음 그 침전물에 위의 용액을 가하여 Teflon plunger로 homogenize하여 얻은 homogenate suspension을 2~3일간 냉장고에 보존해 두었다가 실험에 사용하였다. 이들 모든 조작은 0°~3°C에서 하였다.

단백질의 측정: 뇌 조직 homogenate 내에 함유되어 있는 단백질량은 Biuret (1964)방법으로 측정하였다.

무기인산의 측정: Incubation medium에 가한 ATP가 ATPase에 의하여 유리되는 무기인산측정은 Fiske-Subbarrow (1925) 방법에 의하였으며, 이때 Coleman Junior Spectrophotometer를 사용하여 파장 660 mμ에서 흡광도를 측정하였다.

ATPase 활성도의 측정: 백서 뇌 조직 homogenate 내 ATPase 활성도는 Lee and Yu (1964)방법으로 측정하였는데, 즉 incubation medium에 ATP를 첨가한 후에 ATP가 homogenate 내 ATPase에 의하여 유리되는 무기인산을 측정하여 이를 ATPase 활성도로 하였다.

실험과정에 있어 incubation은 37°C에서 하였고, 본 실험에 사용한 각종 용액은 demineralized water를 사용하여 만들었다. 실험성적은 각각 재료를 달리한 5회 성적의 평균치이다.

시약: 본 실험에 사용한 중요 시약은 다음과 같다.

Tris (hydroxy methyl) amino methane (Sigma), Histidine (Sigma), Bovine serum albumin (Sigma), Adenosine triphosphate (Sigma), Disodium ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA, Fisher), Phenobarbital (Merck), Amobarbital (Vitarine co) Diazepam (SAF co), Promazine (SK&F labs), Chlorpromazine (SK&F labs),

실험 성적

1. 뇌 피질 homogenate 내 단백질량과 ATPase 활성도와의 관계:

이 실험에 있어서는 Na-K ATPase가 뇌 피질 homo-

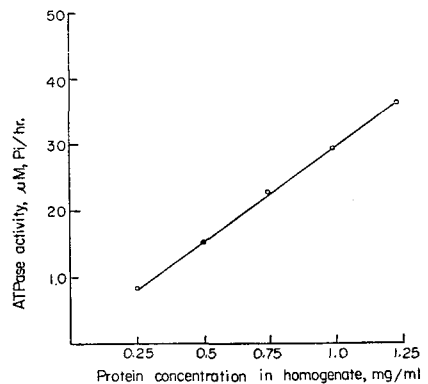


Fig. 1. The relationship between the protein content and ATPase activity of brain cortex homogenate.

Table 2. The effect of phenobarbital on ATPase activity

Composition	Tube No.	Tube No.										F.C.(mM)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
50 mM T-HCl buffer	(ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	10
15 mM MgCl ₂	(//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.5
100 mM KCl	(//)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	10
1 M NaCl	(//)	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	100
10 ⁻² M Phenobarbital	(//)	—	0.01	0.03	0.05	0.1	—	0.01	0.03	0.05	0.1	—
15 mM ATP	(//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.5
1 mM EDTA	(//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Homogenate, 10mg/ml protein	(//)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1(mg)
Distilled water	(//)	0.4	0.39	0.37	0.35	0.3	0.2	0.19	0.17	0.15	0.1	—
Pi	(μM)	19.5	21.2	22.4	23.3	23.7	29.2	31.3	29.4	28.7	27.6	

genate 내 단백질량 변동에 따라 어떠한 영향을 받는가를 관찰하였다. Incubation medium의 조성은 제 1 표에 보인 바와 같으며 medium의 전량은 1 ml로 하였다. 먼저 homogenate 내에 포함되어 있는 단백질량을 측정하고 homogenate 1 ml에 단백질 10 mg을 함유하도록 앞서 조직 분리시에 사용한 냉각한 용액으로 희석하였다 제 1 표 및 제 1 도에 보는바와 같이 단백질 농도 증가에 따라 ATPase의 활성도는 증가되었다(제 1 표 및 제 1 도).

2. 수종의 최면제 및 안정제가 Mg ATPase 및 Na-K ATPase 활성도에 미치는 영향 :

이 실험에 있어서는 최면제인 phenobarbital과 amobarbital, 미약한 안정제에 속하는 diazepam, 그리고 phenothiazine 유도체로서 강력한 안정제인 promazine과 chlorpromazine 등 약물이 백서 뇌 피질 homogenate 내 Mg ATPase 및 Na-K ATPase에 미치는 영향을 관찰

한 것인데 incubation medium의 조성은 제 2 표에 표시한 바와 같으며 제 3 도에서 제 6 도에 이르는 실험성적의 incubation medium의 조성도 제 2 표에 제시한 조성 중 약물의 종류만 다른것으로 미치한 것이다(제 2 표).

i) Phenobarbital의 영향 :

뇌 피질 homogenate 내 Mg 및 Na-K ATPase 활성도에 미치는 phenobarbital의 영향을 보면 제 2 표 및 제 2 도에 나타난 바와 같이 0.1 mM에서 1 mM에 이르는 phenobarbital 농도 증가에 따라 Na-K ATPase는 경미하게 억제되었고 Mg ATPase는 오히려 더 활성화되었다(제 2 표 및 제 2 도).

ii) Amobarbital의 영향 :

이 실험에 있어서는 Na-K ATPase와 Mg ATPase 활성도에 미치는 amobarbital의 영향을 관찰하였는데 제 3 도에 보는바와 같이 0.1 mM에서 1 mM에 이르는 amobarbital 농도에서 Na-K ATPase는 경도로 억제되었고 Mg ATPase는 더 활성화되었는데 이는 앞서의

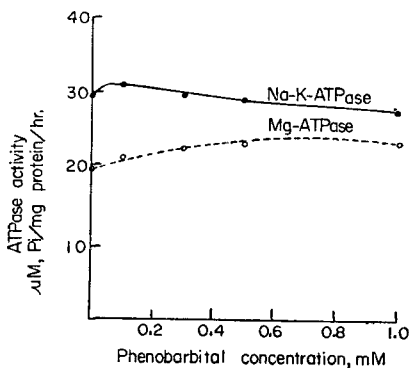


Fig. 2. The effect of phenobarbital on Mg-ATPase and Na-K-ATPase activities.

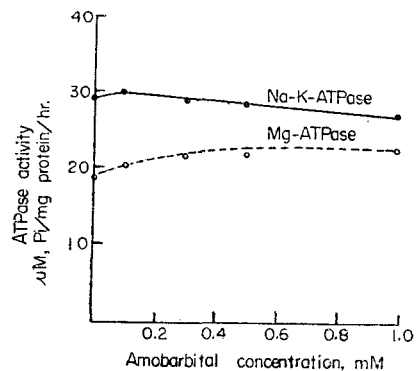


Fig. 3. The effect of amobarbital on Mg-ATPase and Na-K-ATPase activities.

phenobarbital의 영향과 흡사하였다(제 3 도).

iii) Diazepam의 영향 :

뇌 피질 homogenate내 Mg ATPase와 Na-K ATPase에 미치는 diazepam의 영향을 보았던바 제 4 도에 보는바와 같이 0.1 mM에서 1 mM에 이르는 diazepam 농도 증가에 따라 Mg 및 Na-K ATPase 양군 공히 현저히 억제되었다(제 4 도).

iv) Promazine의 영향 :

이 실험에 있어서는 Mg ATPase 및 Na-K ATPase에 미치는 promazine의 영향을 관찰하였던바 제 5 도에 보는바와 같이 0.1 mM에서 1 mM에 이르는 promazine 농도 변동에 따라 Mg 및 Na-K ATPase 양군 다 같이 현저히 억제되었다(제 5 도).

V) Chlorpromazine의 영향 :

뇌 피질 homogenate내 Mg ATPase와 Na-K ATPase에 미치는 chlorpromazine의 영향을 보았던바 제 6 도에 보는바와 같이 0.01 mM에서 0.1 mM에 이르는 chlor-

promazine 농도 변동에 따라 Mg 및 Na-K ATPase가 현저히 억제되었으며 Na-K ATPase보다는 Mg ATPase가 더 심히 억제되었다(제 6 도).

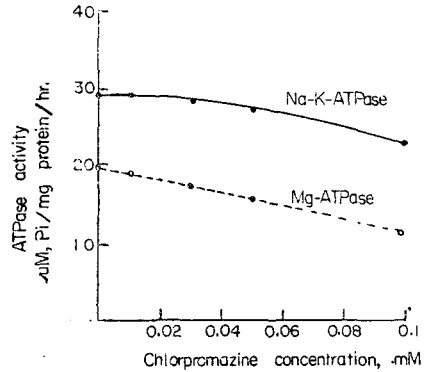


Fig. 6. The effect of chlorpromazine on Mg-ATPase and Na-K-ATPase activities.

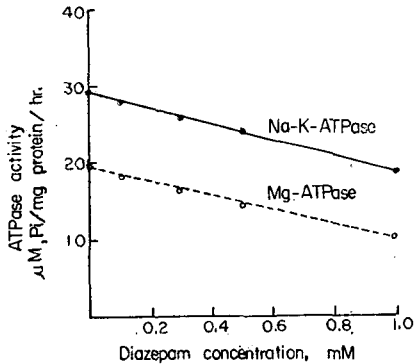


Fig. 4. The effect of diazepam on Mg-ATPase and Na-K-ATPase activities.

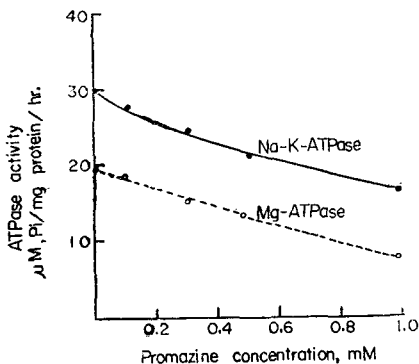


Fig. 5. The effect of promazine on Mg-ATPase and Na-K-ATPase activities.

고 찰

백서 뇌 피질 homogenate에 의하여 ATP로부터 무기인산을 유리시킨 것으로 보아 다른 조직과 마찬가지로 이 homogenate 내에도 ATPase가 존재함을 알수 있다.

본 실험에서 최면제인 phenobarbital과 amobarbital은 Na-K ATPase를 경도로 억제하였지만 이들 약물의 최면작용과 ATPase의 억제와의 관련을 부인할 수 없으며 특히 1 mM 이상의 농도에서는 이들 두 약물 모두 ATPase를 현저히 억제하였기 때문에 그러하다 하겠다.

그리고 diazepam도 Mg 및 Na-K ATPase를 현저히 억제하는 것으로 보아 diazepam에 의한 진정작용이 이 효소계와 밀접한 관련이 있는 것으로 본다.

근래에 와서 전신마취제의 작용과 Na-K ATPase의 억제사이에는 밀접한 관련이 있다고 하였으며 (Judah and Ahmed (1964), Davis and Brody (1966), 김(1972)), 더욱이 여러 연구자들이 phenothiazine 유도체의 각종 생물 화학적 및 물리화학적 작용과 진정제로서의 효과 사이에는 밀접한 관련이 있을 것이라고 암시하였는데 (Guth and Spirtes 1964), 즉 phenothiazine에 의하여 유도된 세포막 투과성의 변화가 phenothiazine의 물리 화학적 작용에 기초를 두고 있을 것이라고 가정하였다. 그래서 그들은 phenothiazine이 소위 "membrane stabilizers"로서 역할한다고 주장하였다.

한편 McIlwain (1962)은 phenothiazine 유도체인 ch-

lorpromazine 이 뇌 피질 조직 절편에서 K^+ 의 유출을 감소시킨다고 하였다.

Phenothiazine의 유도체인 promazine 과 chlorpromazine 이 ATPase 활성도에 미치는 영향을 관찰한 본 실험에서는 이들 약물에 의하여 Mg 및 Na-K ATPase 활성도가 현저히 억제되었는데 세포막 운반체를 통한 양 이온의 능동적 이동과 밀접한 관련이 있다는 뇌 피질 homogenate 내 ATPase 의 phenothiazine 유도체에 의한 억제는 이온과 물 투과성 변화로서 설명이 가능하기에 앞서의 phenothiazine 유도체가 membran stabilization 으로서 역할한다고 주장한 가설은 실제로 사실과 상이하다고 사료된다.

그리고 김(1972)은 대부분의 전신 마취제가 Mg ATPase 보다는 Na-K ATPase 를 더 현저히 억제하기에 중추신경 억제제와 Na-K ATPase 의 억제사이에는 밀접한 관련이 있으며 Na^+ 과 K^+ 의 전도억제와 Mg 및 Na-K ATPase 억제는 억제제와 신경세포막사이의 같은 상호작용의 현상이라고 하였는바 본 실험에서는 수종의 안정제가 Mg 및 Na-K ATPase 를 다같이 현저히 억제시킨 것으로 보아 전술한 바와 같이 전신억제제와 Na-K ATPase 사이와 같이 아주 밀접하지는 않지만 이들 약물의 작용은 Na-K ATPase 뿐만 아니라 Mg ATPase 도 억제하여 나타나는 것으로 사료된다.

결 론

백서 뇌 피질 homogenate 내 Mg ATPase 및 Na-K ATPase 에 미치는 수종의 최면제 및 안정제의 영향을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백서 뇌 피질 homogenate 내의 Na-K ATPase 는 phenobarbital 및 amobarbital 에 의하여 경미하게 억제되었으며 Mg ATPase 는 더 활성화되었다.

2. 이 homogenate 내의 Mg 및 Na-K ATPase 는 diazepam 에 의하여 현저히 억제되었다.

3. Promazine 및 chlorpromazine 은 Mg 및 Na-K ATPase 를 양자 모두 현저히 억제하였다.

이상의 사실로 보아 최면 및 안정제의 정도와 ATPase 의 억제사이에는 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

Davis, P.W. and Brody, T.M.: *Inhibition of Na^+ K^+ -activated adenosine triphosphatase activity in*

rat brain by substituted phenothiazines. Biochem. Pharmac. 15:703, 1966.

Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375, 1925.*

Glynn, I.M.: *The ionic permeability of the red cell membrane. Progress in Biophysics. 8:241, 1957.*

Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmac. Rev. 16:381, 1964.*

Guth, P.S. and Spirtes, M.A.: *Int. Rev. Neurobiol. 7: 231, 1964.*

Hoffmann, J.F.: *The link between metabolism and the active transport of Na in human red cell ghosts. Fed. Proc. 19:127, 1960.*

Järnefelt, J.: *Properties and possible mechanism of the Na^+ and K^+ -stimulated microsomal adenosine triphosphatase. Biochim. Biophys. Acta 59: 643, 1962.*

Judah, J.D. and Ahmed, K.: *Inhibitors of transport and cation activated ATPases. J. cell comp. Physiol. 64:355, 1964.*

김석주: 백서 뇌 피질 Homogenate 내 ATPase 활성도에 관한 연구. 부산의대잡지 12:159, 1972.

Lee, K.S. and Yu, D.H.: *A study of the sodium and potassium activated ATPase activity of heart microsomal fraction. Biochem. Pharmac. 12: 1253, 1964.*

McIlwain, H.: *Appraising enzymic actions of central depressants by examining cerebral tissues. In: CIBA symposium on enzymes and drug action. Editors: A.V.S. de Reuk and J.L. Mongar 170, 1962.*

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 erythrocytes. J. Biol. Chem. 235:1796, 1960.*

Skou, J.C.: *Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45:596, 1965.*

Taylor, C.B.: *The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphatase of rabbit kidney in vitro. Biochem. Pharmacol. 12:539, 1963.*