

Kanamycin 및 Kanendomycin 이 인공 stearic acid 단분자막에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

이 승 일 · 강 두 희

=Abstract=

Effects of Kanendomycin, Kanamycin on Stearic Acid Monolayer

Syng Il Lee and Doo Hee Kang M.D., Ph. D.

Department of Physiology, Yonsei University College of Medicine

It has been reported that kanamycin lowers osmotic fragility and mechanical fragility by ultrasonification of human red cells. In the present study, we therefore investigated effects of Ca^{2+} , kanendomycin and kanamycin on stearic acid monolayer using a langmuir trough and found following results

- 1) Ca^{2+} added to the subphase condensed stearic acid monolayer, confirming earlier reports.
- 2) Likewise, kanendomycin and kanamycin condensed the stearic acid monolayer, the effects being dose dependent.

The possible modes of action of kanamycin and kanendomycin on biological membrane were discussed and compared with those of Ca^{2+} and local anesthetics

I. 서 론

세포막을 구성하고 있는 지질중 특히 long chain 을 가진 지상산은 물과의 경계면(interface)에서 단분자막(monomolecular layer)을 형성하며 여러약물들의 이에 대한 영향 즉 단분자막의 확대 또는 수축에 따른 표면장력의 변화, (Pockel 1891, Rayleigh 1899) 표면 에너지 변화에 따른 분자배치(molecular configuration), 표면방향성(surface orientation), 침투(penetration)등을 관찰하여 생체막에서 일어나는 현상을 추측해 왔었다(Langmuir 1917, Adam 1941, Harkins 1952).

Langmuir(1937)는 생체내에서 세포막 투과도, 신경전달, 근육수축, 효소반응등에 중요한 역할을 하고 있는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 인공 stearic acid 단분자막에서 이들 이온이 없을때에 비해 면적-장력 곡선($\pi-\sigma$ curve)

* 본 연구는 1974 및 1975년도 유한연구비의 지원으로 이루어 졌음.

을 응축시켰음을 보고하였고 이와같은 Ca^{2+} 의 단분자막 응축현상이 세포막에서도 있을 것이라고 추측했다.

특히 Skou(1954)는 신경전도를 차단하는 국소마취제(procaine, lidocaine)나 알칼 혹은 다른 막안정제(veratramine)의 약리작용의 강도는 stearic acid 단분자막의 표면압력 증가와 밀접한 관계가 있는 것으로 보아 이 약물들이 세포막에서도 동일한 효과가 있을 것이라고 보고했다.

그런데 최근에 항생제인 kanamycin 이 적혈구막에서 농도 증가에 따라 Na^{22} 의 투과도를 증가시키나 삼투압 차에 의한 용혈을 방지하고 기계적인 충격 즉 ultrasonification으로 인한 용혈도 억제하는 등 막안정제 역할을 함이 보고되었다(홍, 1973).

저자들은 상기 사실로 미루어 이 항생제가 세포막 지질층에 어떤 영향을 줄 것으로 추측하여 본 실험을 시행하였다. 즉 stearic acid 단분자막에 Ca^{2+} 및 kanendomycin, 그리고 kanamycin 첨가 전후의 면적-장력 곡선을 비교하므로써 이들 약물이 세포막에 미치는 상 기 영향과 연관을 맺고져 하였다.

II. 실험방법 및 재료

Langmuir의 hydrophilic balance를 개조하여 제작한 automatic film balance를 깨끗하게 세척하고 plastic 상자를 trough 위에 덮어 주위의 먼지와 표면 활성물질의 오염을 방지한 후 원질용액(substratum 14.5 mM tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.0) 1L를 trough에 채우고 알고있는 무게의 추로 장력의 크기를 교정하고난 다음 인공단분자막을 stearic acid로 만들었다.

즉 petrol ether에 용해시킨 0.05% stearic acid 용액을 micropipett으로 10 μl씩 60 μl를 floating barrier와 compression bar 사이에 끌고루 유포시켰다.

3분간 petrol ether를 완전히 휘발시킨 후 compression bar를 속도 6.4 cm/min 되게 floating barrier 쪽으로 단분자막을 압축하여 이때 형성되는 면적-장력 곡선을 선형 자동변압기(LVDT)를 통해 기록계(Rectiwriter: Texas Instrument Corp.)로 기록했다. stearic acid 단분자막을 압축시킬때 형성되는 면적-장력 곡선을 대조군으로 하고 stearic acid 단분자막을 압축시킨 상태에서 각각의 약물(Ca⁺⁺, kanamycin Kanendomycin)을 농도별로 첨가시키고 잘 섞은뒤에 compression bar를 일단 후퇴시켜 대조군과 같은 방법으로 압축하여 이때 측정된 면적-장력 곡선을 실험군으로하여 대조군과 비교하였다.

III. 실험 성적

상기 실험방법으로 측정된 면적-장력 곡선을 대조군과 실험군에서 비교 관찰했으며 면적-장력 곡선을 구성하고 있는 두개의 상(phase) 즉 액체팽창상(liquid expanded phase)과 고체응축상(solid condensed phase)중 고체응축상을 연장(extrapolation)하여 stearic acid 한분자가 차지하고 있는 단면적을 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{단면적}(\text{\AA}^2/\text{molecule}) = \frac{\text{전체 단분자막의 면적}}{\text{유포한 stearic acid의 무게}} \times \frac{\text{stearic acid 분자량} \times 10^{16}}{6.02 \times 10^{23}}$$

1) Ca⁺⁺이 stearic acid 단분자막에 미치는 영향

원질용액에 Ca⁺⁺을 농도별로 첨가한 후 stearic acid 단분자막의 면적-장력 곡선을 대조군과 비교한 결과 도표 I에서와 같이 Ca⁺⁺이 존재할 때는 면적-장력 곡

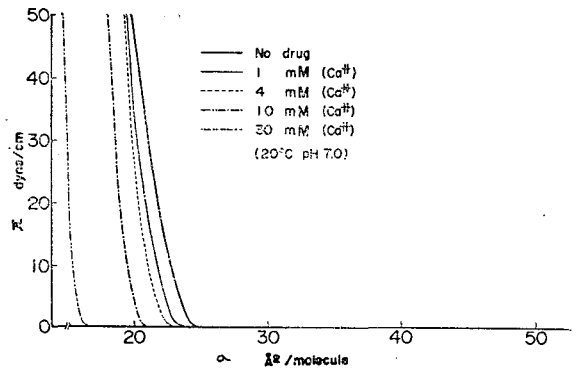


Fig. 1. The effects of Ca⁺⁺ on the π-σ curve for stearic acid monolayer.

선이 대조군에 비해 응축했으며 Ca⁺⁺농도가 증가할 수록 면적-장력 곡선의 응축 정도가 증가하였다.

그러나 30 mM Ca⁺⁺농도에서 완전히 응축 상태에 도달하여 그 이상의 농도의 Ca⁺⁺에 의하여 더 이상 응축되지 않았고 stearic acid 단면적은 도표 I에 표시된 바와 같이 대조군이 23.3±0.4 Å²/molecule 인 반면 실험군은 Ca⁺⁺농도가 증가함에 따라 단면적이 감소하여 30 mM Ca⁺⁺농도에서 1.6±0.6 Å²/molecule로 완전히 응축됐다. 이 대조군에서 얻은 23.3±0.4 Å²/molecule의 값은 Nutting 및 Harkins(1939)가 보고한 24 Å²±0.18 Å²/molecule과 거의 일치하였고 또 Ca⁺⁺에 의한 응축현상도 이제까지 보고된 것(Langmuir 및 Schaefer 1936, Harkins 및 Anderson 1937, David 1965)과 같은 현상을 보였다.

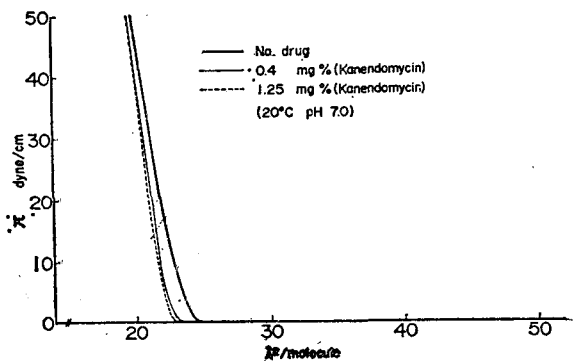


Fig. 2. The effects of Kanendomycin on the π-σ curve for stearic acid monolayer.

2) Kanendomycin O] stearic acid 단분자막에 미치는 영향

Kanendomycin에 의한 영향은 도표 2에 도시되었다. 여기서 보는 바와같이 kanendomycin의 양을 증가함에 따라 stearic acid 단분자막을 점차 응축시켰는데 1.25 mg% kanendomycin 농도에서 이미 응축이 종결되었고 그 이상의 kanendomycin의 첨가에도 별변동이 없었다. 또한 응축이 종결된 면적—장력 곡선에서 측정된 단면적은 $22.3 \pm 0.5 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ 이었다.

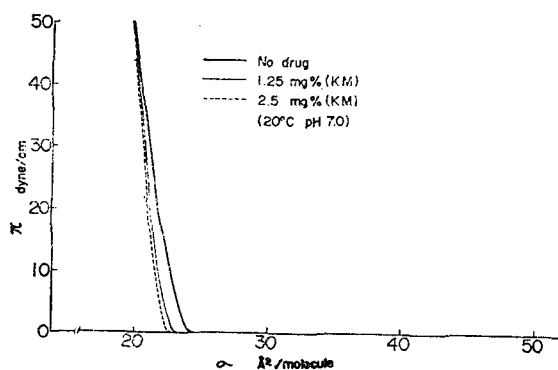


Fig. 3. The effects of Kanamycin on the π - σ curve for stearic acid monolayer.

3) Kanamycin O] stearic acid 단분자막에 미치는 영향

Kanamycin도 kanendomycin과 같이 stearic acid 단분자막을 농도에 비례하여 응축시켰으며(도표 3)이 응축이 완전히 끝난 2.5 mg% kanamycin 농도에서 단면적은 $22.1 \pm 0.45 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ 이었다.

IV. 고 찰

Shanes에 의하면 세포막에 작용하는 약물을 생리학적 혹은 약리학적 측면에서 쉐안 안정제(stabilizer)와 막불안정제(labilizer)로 구별한다. 전자는 자극 등에 의해 흥분성 조직의 전기적 변화와 이온투과도의 변화를 감소시켜 주는 물질을 말하고 후자는 이와같은 변화를 증가시킨다(Shanes, 1953).

즉 막안정제는 세포막 전도성(membrane conductance)을 감소시켜 안정막전위에 변화를 주지 않으나

막불안정제는 이와반대로 막전위를 depolarize 시킨다고 보고했다. 또한 Skou(1954~1958)는 극소마취제나 알콜 그리고 신경전도를 차단하는 막안정제들은 stearic acid 단분자막을 확산(spreading)시키므로써 투과도가 감소하고 실제 이와같은 현상은 세포막에서도 동일한 작용을 할 것이라고 보고했다.

이어서 Skou는 막안정제의 작용기전은 “interfacial dissolution” 즉 단분자막을 용해시켜 단분자막을 확산시키며 이에 따라 측압(lateral pressure)이 증가되고 이같은 측압의 증가는 channel 크기와 이온투과도를 감소시키는 반면 막불안정제는 channel 사이에서 단분자막을 용해시키기 보다 오히려 막에 흡착되어 “subfilm”은 형성하므로써 단분자막을 응축시켜 측압을 감소시킬 것이라고 설명하고 있다.

그러나 Ca^{++} 이 인공 stearic acid 단분자막을 응축시키는 것은 하나 세포막에서 막안정제 역할을 하고 있으므로(Frankenhaeser 및 Hodgkin 1957) 세포막에 작용하는 막안정제와 막불안정제를 stearic acid 단분자막의 응축 또는 확장 현상만으로 분류하려는 Skou의 방법에는 문제점이 있는 것으로 간주된다.

그런데 근자에 임상적으로 많이 쓰이는 kanamycin은 1957년 Umezawa가 처음으로 streptomyces kanamyceticus의 배양액에서 분리한 항생물질로써 이 약물은 mitochondria에서 oxidative phosphorylation을 억제하고(백 1970) 전해질 대사에 중요한 역할을 하는 adenosine triphosphatase ($\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ ATPase)의 활성도가 kanamycin에 의해 억제되었음을 보고한 바 있다(Skou 1965, Ishii et al. 1968, Askari 및 Rao 1970).

또한 이는 적혈구막에서 삼투압차에 의한 용혈을 방지하고 기계적인 충격 즉 ultrasonification으로 인한 용혈을 억제시키는 사실로 보아 kanamycin과 kanendomycin이 세포막에서 막안정제로 작용하며 또 적혈구막에 Ca^{++} 과 서로 상경적으로 결합하는 것으로 보고되었다(홍 1973).

그러나 본실험에서 이들약물이 인공 stearic acid 단분자막의 면적—장력 곡선을 응축시킴을 관찰했다.

그러므로 kanamycin이나 kaendomycin은 인공 stearic acid 단분자막을 응축시키며 또 막안정제로 작용하는 것으로 보아 Ca^{++} 의 작용과 유사한 점이 있고 Ca^{++} 과 서로 상경적결합을 하되 지질단분자막을 확대시키며 막안정제로 작용하는 극소마취제와는 지질단분자막에서의 그작용양상이 상이한 것으로 사료된다.

V. 결 론

Hydrophilic balance 로 Ca^{++} , kanendomycin, kanamycin 첨가 전후에 stearic acid 단분자막의 나타나는 변화양상을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Ca^{++} 은 stearic acid 단분자막을 응축시켰으며 30 mM Ca^{++} 농도에서 단면적 $16 \pm 0.6 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ 로 완전히 응축됐다.

2) Kanendomycin 역시 stearic acid 단분자막을 응축시켰으며 1.25 mg%에서 완전 응축됐다.

3) Kanamycin 도 stearic acid 단분자막을 응축시켰고 2.5 mg%에서 응축이 종결됐다.

이상의 사실로 미루어 kanamycin 이 stearic acid 인공 단분자막을 응축시켰으나 삼투압차에 의해 용혈 방지, 그리고 기계적인 충격 즉 ultrasonification 에 의해 용혈을 억제시키는 사실로 보아 Ca^{++} 과 같이 막안정제*로 작용할 것이라고 사료된다.

(*이 원고 작성후 본교실에서의 진전된 업적에 의하면 Kanamycin 을 준 적혈구에서 혈구의 용적이 감소되는 것이 발견되었으므로 이 기계적 막안정제의 현상이 혈구의 용적의 감소에 의한 것인지도 모르며 이점을 현재 추구중에 있음.)

참 고 문 헌

Bagg J., Abramson. Morris. B., Martin Fichman, Haber. Mary. D., and Gregor. Harry. P.: *Composition of stearic acid monolayers from calcium-containing substrates J. Amer. Chem. Soc.* 86 2759, 1964.

Deamer, David W. and Cornwell, Daoid G.: *Calcium actionon fatty acid and phospholipid monolayers and its relation to the cell membrane Biochim. Biophys. Acta* 116: 552-562, 1966.

Frankenhaeuser, B., and Hodgkin, A.L.: *J. Physiol.*, 169, 438, 1963.

George, L., Gaines, JR.: *Observations on resin-deionized water as a substrate for monolayer studies.*

George, Jura., and Harkins, W.D.: *Surface of solid. A unitary thermodynamic theory of the adsorption of vapors on solids and of*

insoluble films on liquid subphases J. Amer. Chem. Soc. 68, 1941, 1946.

Gershfeld, N.L. and Shanes, A.M.: *Stabilizer and libilizer effects and antagonisms demonstrable with monomolecular films on stearate J. Physiol* 148, 579, 1959.

Gershfeld, N.L. and Shanes, A.M.: *Antagonism of veratrine by Ca^{++} in monolayers of stearic acid Science*, 129, 1427, 1959.

Harkins, W.D. and Anderson, Thomas. F.: *J. Amer. Chem. Soc.* 59, 2189, 1937.

Harkins, W.D.: *The physical chemistry of surface films Reinhold New York* 152, 1952.

Hauser, H. Chapman, D. and Dawson, R.M.C.: *Physical properties of phospholipid Biochem. Biophys. Acta* 183, 320-333, 1969.

홍원표 : Kanamycin 이 적혈구막에 미치는 영향 연세 의대 논문집 6:158, (1973)

Kimizuka, H. and Koketsu, K.: *Binding of calcium ion to lecithin film Nature* 196, 995, 1962.

Lamer, Victor, K. and Robbins, Max L.: *The effect of the spreading solvent on the properties of monolayers J. Phys. Chem.* 62, 1291, 1958.

Langmuir I. and Schaefer, V.J.: *Composition of fatty acid films on water containing calcium or barium salts J. Amer. Chem. Soc.* 56, 284, 1936.

Langmuir, I. and Schaefer, V.J.: *The effect of dissolved salts on insoluble monolayers J. Amer. Chem. Soc.* 59, 2400, 1937.

Nutting, George C. and Harkins, W.D.: *Pressure-Area relation of fatty acid and alcohol monolayers J. Amer. Chem. Soc.* 61, 1180, 1939.

백기우 : Kanamycin 과 Kanendomycin 이 백서간의 mitochondria 의 oxidative phosphorylation 에 미치는 영향 연세의대 논문집 3:87, 1970

Papadjopoulos, Demertios: *Surface properties of acidic phospholipids interaction of monolayers and hydrated liquid cristals with uniaand bivalent metal ion Biochim. Biophys. Acta.* 163, 240-254, 1968.

Philips, M.C. and Chapman, D.: *Monolayer char-*

- acteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamine at the air water interface Biochim. Biophys. Acta. 163, 301-313 1968,*
- Rideal, at al.: *Interfacial phenomenon Academic Press, London 1961.*
- Shanes, A.M.: *Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells Part I. The resulting cell and its alternation by extrinsic factors Pharmacol. Rev. 10, 59, 1958.*
- Shanes, A.M.: *Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells. Part II. Action potential and excitation Pharmacol. Rev. 10, 165, 1958.*
- Shanes, A.M., and Gershfeld N.L.: *Interactions of veratrum alkaloids, procaine and calcium with monolayers of stearic acid and their implications for pharmacological action J. of Gen. Physiol. 44 345, 1960.*
- Skou, Jens Chr.: *Relation between the ability of various compounds to block nervous conduction and their penetration into a monomolecular layer of nerve-tissue lipoids Biochim. et Biophysica. Acta. 30, 625, 1958.*