

Thallium-201을 이용한 세포막 Na⁺-K⁺ ATPase 활성도 측정: Rubidium-86 측정법과의 비교

경북대학교 의과대학 핵의학교실, 계명대학교 의과대학 내과학교실¹

이재태 · 이인규¹ · 손상균 · 이규보

= Abstract =

Quantitative Measurement of Membrane Na⁺-K⁺ ATPase Activity using Thallium-201: Comparison with Rubidium-86

Jaetae Lee, M.D., In Kyu Lee, M.D.¹, Sang Kyun Sohn, M.D. and Kyu Bo Lee, M.D.

*Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University School of Medicine,
and Department of Internal Medicine¹, Kyemyung University School of Medicine, Taegu, Korea*

Purpose: Na⁺-K⁺ ATPase activity has been estimated by the degree of inhibition of cation transport by cardiac glycosides (ouabain) using Rb-86 as a substrate. The biological characteristic of Tl-201 is known to be similar to those of potassium as a transport substrate in the presence of glucose, insulin or phobol myristate acetate (PMA). The purpose of this study was to measure ouabain sensitive Na⁺-K⁺ ATPase activity using Tl-201 and compare with that using Rb-86. **Materials and Methods:** Smooth muscle cells isolated from rat aorta or human placental umbilical artery were cultured, and used to measure cellular Na⁺-K⁺ ATPase activity. Na⁺-K⁺ ATPase activity was measured as a percentage decrease in cellular uptake of Tl-201 or Rb-86 by ouabain under the presence of glucose, insulin or PMA in media. **Results:** Na⁺-K⁺ ATPase activity measured with Tl-201, as a transport substrate, was not different from those measured with Rb-86 in rat or human smooth muscle cell preparation. Incubation with high concentration glucose resulted in about 30% decrease in enzyme activity. In contrast, insulin or PMA resulted in 50-70% or 28% increases from baseline activity, respectively. **Conclusion:** These results suggests that Tl-201 could replace Rb-86 in measurement of ouabain sensitive Na⁺-K⁺ ATPase activity in vitro. High level of glucose concentration decreased cellular Na⁺-K⁺ ATPase activity, but insulin or PMA increased it. (*Korean J Nucl Med* 1998;32:121-8)

Key Words: Na⁺-K⁺ ATPase activity, Thallium-201, Rubidium-86

Corresponding Author: Jaetae Lee, M.D., Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University Hospital, Samduk 2-Ga 50, Taegu 700-421, Korea
Tel: 82-53-420-5586, Fax: 82-53-426-3206,
E-mail: jaetae@bh.kyungpook.ac.kr

서 론

* 이 논문은 1996년 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Na⁺-K⁺ ATPase는 모든 생체세포의 세포활동, 세포구조의 유지, 세포의 수축, 성장 및 분화과정에 매

우 중요한 작용을 하는 세포막에 존재하는 효소이다¹⁾. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase의 가장 중요한 기능은 세포내의 Na^+ 농도를 낮게 유지하고 세포 외의 K^+ 농도를 높게 유지하는 것으로서, 이와 같은 이온농도의 차이는 세포막 사이의 전위차 유지에 그 중추적인 기능을 담당하고 있다^{2,4)}. 특히 근육과 신경세포의 흥분 시에는 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도가 뚜렷하게 증가한다고 보고된 바가 있다³⁾.

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 효소 활성도의 평가는 세포의 간질에 존재하는 과다한 K^+ 이온을 세포 내로 이동시키는 능력을 측정함으로써 가능하다. 세포막의 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도를 측정에 가장 많이 이용되는 방법은 potassium 유도체인 rubidium, 특히 rubidium-86 (Rb-86)을 이용한 측정법으로서⁵⁾, 간편하고 반복 검사간의 차이가 비교적 적은 검사법으로 알려져 있다. Rb-86은 화학주기율표에서 K^+ 에 유사한 IA족이나, 국내생산이 안되어 구입이 어렵고 베타선을 방출하는 핵종이어서 베타계수를 사용하기 위한 검체의 재처리과정의 필요성이 있다. Tl-201은 핵의학 분야에서 허혈성 심장병의 진단과 악성종양의 감별진단 등에 이용되는 양이온으로서 생체 내에서의 분포가 potassium (K)과 유사하다^{6,7)}. Tl-201이 심근세포에 분포되는 기전은 다양하나 혈류의 분포 정도에 따라 분배된 Tl-201이 세포막의 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase에 의존 하에 심근 내로 이동되고 K^+ 와 같은 장소에 축적되고 재분배된다. Tl-201은 생존력 (viability)이 있는 세포에만 섭취된다고 알려져 있어⁸⁾, 만성관동맥질환에서 동면상태의 심근(hibernating myocardium)을 진단하거나 중앙조직과 괴사조직의 감별진단에 사용되는 근거가 된다⁹⁻¹⁰⁾. 최근 관동맥 질환 환자에서 인슐린과 포도당을 사용하면 세포내 Tl-201의 섭취를 높일 수 있어 Tl-201 영상술을 이용한 생존심근의 진단율을 증가시킬 수 있다는 보고가 있었다^{10,11)}. 여기에 관여하는 정확한 기전은 알 수 없으나 인슐린이나 포도당의 사용이 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase를 활성화시켜 Tl-201의 세포내 이동을 촉진시킨다고 추측되고 있다.

저자들은 핵의학영상에 널리 이용되고 있는 감마선방출 핵종인 Tl-201을 이용하여 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도 측정이 가능한가를 알아보고자 배양한 백서

대동맥 평활근세포와 사람 제대동맥 평활근세포에서 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도를 측정하고 기존 Rb-86으로 측정한 방법과 비교하였다. 또한 대동맥 평활근 세포와 인체제대동맥의 평활근세포에서 포도당과 인슐린 및 세포막의 protein kinase-C (PKC)의 활성도를 증가시킨다고 알려진 phobol myristate acetate (PMA)의 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도에 대한 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양 및 조건

100 g 전후의 Sprague Dawley 종의 백서에서 흉부대동맥을 채취하여 수술칼로 0.5X0.5 cm 크기의 분절로 잘게 나누어 mesh로 대동맥 평활근세포를 분리하였다. 얻어진 세포는 10%의 fetal calf serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : GIBCO, Grand Island, NY) 배양액에 넣어 배양하였다. 사람의 평활근세포는 같은 방법으로 신생아의 제대에서 분리한 제대동맥 평활근세포를 배양 후 사용하였다. 12-well의 배양용기에서 밀생상태(confluent state)가 되면 2%의 FBS가 포함된 혈중 생리적인 포도당농도(5.5 mM)와 고농도(22 mM)의 포도당, 인슐린, 또는 phobol myristate acetate (PMA)가 포함된 DMEM에 노출시켜 실험하였다.

2. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도의 측정

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도의 측정은 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase에 의한 Rb-86의 이동이 정상세포에서 정상기질인 K^+ 의 이동과 거의 유사하다는 보고¹²⁾에 근거하여 아래와 같은 방법으로 측정하였고, Tl-201을 이용한 측정법도 Rb-86을 이용한 방법에 의거하여 시행하였다. 즉 백서의 대동맥 평활근세포와 사람의 제대동맥 평활근세포를 12-well 용기에 밀생상태가 되게 배양하고 24시간 동안 2%의 FBS가 든 배양액에 둔 후 실험하고자 하는 첨가약제에 따라 1일에서 4일간 적절한 조건으로 배양하였다. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 측정은 배양된 세포를 혈청을 첨가하지 않은 DMEM 배양액으로 먼저 2회 세척하고, 2 mM의

ouabain이 든 DMEM 배양액과 ouabain이 첨가되지 않은 DMEM 배양액으로 10분간 배양하고 Rb-86 (비방사능: 67.8 uCi/mmol; DuPont/NEN) 혹은 Tl-201 (Dupont USA, 비방사능 2.14×10⁵ Ci/g)을 well당 1 uCi/ml (3.7×10⁴ Bq/ml) 농도로 첨가한 후 10분간 더 배양하였다. 이어 흡인기로 상층배양액을 완전히 빨아내고 하층부를 분리하였고, 얼음에 식힌 100 mM MgCl₂ 용액으로 4차례 세척한다. 세척을 마친 후 0.5 ml의 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액으로 추출하여 상층액을 Rb-86은 베타 선계수기(Tricarb 1600 CA, Packard, USA), Tl-201

은 감마선계수기(Quantum, Packard, USA)에 넣고 측정하였다. 이때 ouabain에 의하여 억제되는 부분의 Rb-86이나 Tl-201 섭취율을 ouabain에 민감한 Na⁺-K⁺ ATPase활성도(ouabain-sensitive Na⁺-K⁺ ATPase activity)로 간주하여, 아래와 같은 공식으로 계산하였다^{1,5,13,14}.

$$\text{Ouabain-sensitive Na}^+\text{-K}^+\text{ ATPase Activity} = \text{Count [Ouabain (-)]} - \text{Count [Ouabain (+)]}$$

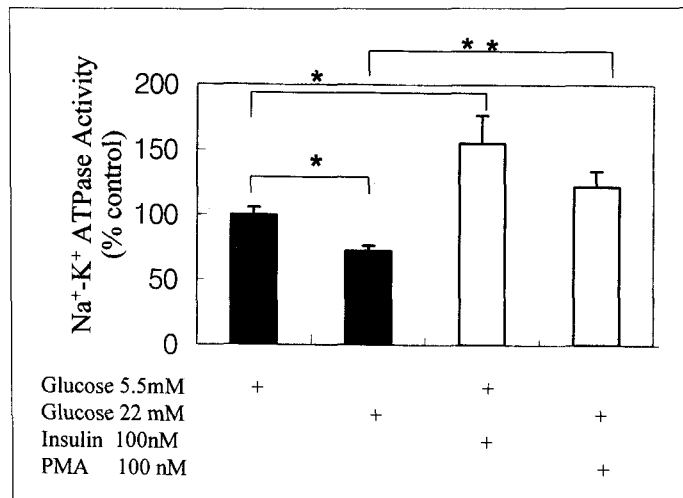


Fig. 1. The effects of glucose concentration (5.5&22 mM), Insulin (100 nM), PMA (100 nM) on Na⁺-K⁺ ATPase activity as measured by ouabain sensitive Tl-201 uptake in rat vascular smooth muscle cells. The results are expressed as the mean±SE. *p<0.01. **p<0.05.

Table 1. The Effects of Glucose Concentration and Insulin on Na⁺-K⁺ ATPase Activity as Measured by Ouabain Sensitive Tl-201 Uptake in Rat and Human Vascular Smooth Muscle Cells

	Glucose (5.5 mM)	Glucose (22 mM)	Glucose 5.5 mM+Insulin (100 nM)
RASMC (% control)	100±5.8	72.3± 4.1	155.2±21.3
HUASMC (% control)	100±6.8	69.8±12.5	170.5±17.8
P value		NS	NS

RASMC, rat aortic vascular smooth muscle cell; HASMC, human umbilical arterial smooth muscle cell; NS, not significant; P value, RASMC vs HASMC. * The results are expressed as the mean±SE. +NS; not significantly different

Table 2. The Effects of Glucose Concentration and PMA on Na⁺-K⁺ ATPase Activity as Measured by Ouabain Sensitive TI-201 Uptake Compared with Rb-86 Uptake in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

	Glucose (5.5 mM)	Glucose (22 mM)	Glucose (22 mM)+PMA (100 nM)
TI-201 (% control)	100 ± 9.2	71.6 ± 4.2	120.2 ± 11.8
Rb-86 (% control)	100 ± 10.9	62.2 ± 12.8	127.4 ± 2.7
P value		NS	NS

NS, not significant; P value, TI-201 uptake vs Rb-86 uptake; * The results are expressed as the mean ± SE.

결 과

1. 고농도 포도당, 인슐린 및 PMA가 세포막 Na⁺-K⁺ ATPase 활성도에 미치는 영향

백서 대동맥 평활근세포의 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성도는 고농도 포도당 배양액(22 mM) 상태에서 배양하였을 때, 저농도 포도당 배양액(5.5 mM) 상태에 비하여 27.7%의 저하를 볼 수 있었으며(p < 0.01), 인슐린(100 nM)을 24시간 첨가 배양하였을 때는 155.2 ± 21.3%로 55%의 증가를 볼 수 있었다(p < 0.05). 그리고 Protein Kinase C 활성을 증가시키는 PMA (100 mM) 투여시에는 120.2 ± 11.8%로 20.2%의 증가를 나타내었다(Fig. 1). 사람의 제대동맥 평활근세포를 이용한 실험에서도 고농도 포도당 배양액(22 mM) 상태에서 배양하였을 때는 69.8 ± 12.5%로 저농도 포도당 배양액(5.5 mM) 상태에 비하여 30.2%의 저하를 볼 수 있었다(p < 0.01). 그리고 고농도 포도당 배양액과 인슐린 첨가시의 Na⁺-K⁺ ATPase 활성도 변화는 사람과 백서 대동맥 세포사이에 차이를 볼 수 없었다(Table 1).

2. Rb-86과 TI-201을 이용한 세포막 Na⁺-K⁺ ATPase 활성도 측정

TI-201을 사용하여 측정된 ouabain에 민감한 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성도는 Rb-86을 이용하여 얻은 값과 유사하였다(Table 2). 생리농도의 포도당(5.5 mM)이 포함된 DMEM 배양액에서의 TI-201과 Rb-86의 섭취율을 100%로 하였을 때 고농도의 포도당(22 mM) DMEM 배양액에서는 TI-201을 이용하였을 때의 섭취율이 약간 낮았고, 고농도의 포도

당과 100 nM의 PMA를 첨가시킨 배양액에서의 결과는 Rb-86을 이용한 경우의 섭취율이 약간 낮은 듯하였으나, 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.

고 찰

Na⁺-K⁺ ATPase는 생체세포막에 매몰되어있는 효소로서 생체막을 통한 전해질 이동을 조절하여 적절한 세포내 환경을 유지하는 작용을 하며, 이 과정에서 세포질내의 대량의 ATP를 소모하는 효소이므로 이 효소의 활성은 세포대사 및 에너지대사의 균형에 중요하다¹³⁻¹⁵. Na⁺-K⁺ ATPase는 기능단위가 2개의 α와 β의 subunit로 구성된 여러 개의 펩타이드 고리로 구성되어있고 α-subunit는 세포내면 측에서 1) 여러 약제와 호르몬에 대한 수용기 기능, 2) 이온 펌프기능 3) ATPase 효소로서의 기능을 가진 활성 부분이다. 효소의 작용방식은 1몰의 ATP가 가수분해시 유리되는 에너지를 이용하는 3몰의 Na⁺ 이온이 전기화학적 경사에 역행하여 세포 밖으로 이동하고, 이에 수반하여 2몰의 K⁺이 전기적 경사에 따르거나 화학적 경사에 역행하여 세포내로 들어오게 되므로 세포막에 하나의 양이온이 남게된다. 이에 따라 세포의 전기적 성질을 띄게되며, 이는 조직마다 달라서 여러 조직에서는 각기 다른 안정성 막전압을 유지하게 한다. 효소의 활성화에 영향을 미치는 인자는 세포의 K⁺농도, 세포내 Na⁺농도, 온도, 막지질의 유동성 등이 있고, 디지탈리스 등의 강심배당체(cardiac glycoside)는 심근에서 이 효소를 억제함으로써 약리학적 효과를 나타내므로 배당강심제는 양이온의 이동, 이온운반체계의 동정 및 이와 관련된 역동학적인 연구에 널리 사용되어왔다^{15,16}. 배당강

심제중 ouabain (g-strophanthin)은 특히 수용성이 높아 실험에서 많이 이용되고 있어, ouabain에 의하여 억제되는 양이온의 이동정도를 통하여 평가함으로써 Na⁺-K⁺ ATPase 효소활성도를 측정할 수 있다^{5,15,16}).

Na⁺-K⁺ ATPase 활성도를 측정하는 방법은 여러 가지가 있는데, 이온교환에 관련된 동적인 매개변수들을 측정함으로써 Na⁺-K⁺ 펌프의 운반기질에 대한 친화도(affinity)를 반정량적으로 측정할 수 있고, 측정방법에 따라 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 세포나 조직에서 K⁺를 통하여 일어나는 ouabain민감성 Rb⁺-86 섭취율을 구하거나^{5,15,16}, 투과성이 유지되게 분리한 세포나 세포막에서 Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺의 존재 하에 ATP의 ouabain민감성 또는 K⁺의존성 가수분해를 측정하는 방법이다¹⁷⁻¹⁹. ATP대신 3-O-methylfluorescence phosphate 또는 p-nitrophenyl phosphate를 사용하기도 한다. 특히 Na⁺-K⁺ ATPase의 아형에 따라 ⁸⁶Rb⁺ (K⁺)섭취나 ATP의 가수분해에 관여하는 면모가 달라서 이 효소의 각각 다른 농도의 ouabain에 대한 민감성 정도를 규명함으로써 효소 아형의 작용을 구별할 수 있다고 한다. 즉 ouabain농도 10 μM 이하에서는 α₂/α₃ 아형에 의한 억제가 일어나고, α₁ 아형이 완전 억제되는데는 ouabain농도 1 mM이상이 필요하며, α₂와 α₃의 아형의 구분도 농도의 차이를 이용하면 가능하다¹⁶. 또한 세포표면의 펌프분자를 정확하게 평가할 수 있다면 Na,K 펌프를 통한 시간당 배출되는 이온의 수를 쉽게 계산할 수 있다. 세포표면의 펌프분자는 세포 균질액이나 분리된 세포막에서 [H-3]ouabain의 분획에 대한 결합정도나, 효소 각각의 아형에 특이하게 결합하는 단일클론항체를 이용한 immunoblotting으로 측정할 수 있다. K⁺의 Na⁺-K⁺ ATPase에 대한 결합친화력(affinity)은 매우 높아 ouabain-민감성 K⁺에 대한 포화능(saturation level)은 ouabain 결합으로 환산시 2 mol/mol정도이다. K⁺결합은 비특이적 결합은 영향이 없는 농도의 Na⁺에 의하여 특이하게 억제되고, Na⁺ 이외에도 여러 종류의 다가양이온에 의하여도 경쟁적으로 억제되는데 이들의 결합강도는 Tl⁺ > Rb⁺ (> K⁺) > NH₄⁺ > Cs⁺ (> Na⁺) > Li⁺의 순이다¹³. 이러한 Tl⁺의 높은 결합력은 Tl-201이

Na⁺-K⁺ ATPase의 활성도를 측정할 수 있는 기질로 사용될 수 있다는 사실을 제시한다.

Na⁺-K⁺ ATPase 활성도를 측정하는 방법으로 연구자들이 가장 많이 이용해온 방법은 간세포, 지방세포, 근육세포, 백혈구 및 적혈구를 재료로 사용하고 Rb-86을 운반물질로 이용하는 방법이다. 저자들의 연구결과는 베타선 방출핵종으로서 국내생산이 쉽지 않은 Rb-86을 대신하여 Tl-201을 사용하여도 세포의 Na⁺-K⁺ ATPase 활성도를 측정할 수 있어 이에 관련된 연구에 보다 편리하게 이용할 수 있으리라 판단된다. Matsui 등¹⁴)은 베타선 방출핵종인 Tl-204 chloride를 이용하여 Na⁺-K⁺ ATPase를 측정하여 저자들과 유사한 결과를 보고한 바가 있는데, Tl⁺으로 측정할 때는 2가 양이온의 오염가능성을 방지하는 EDTA를 사용하면 탈착화반응(chelation)이 일어나므로 이 과정을 생략하여야 한다고 하였다. Thallium은 potassium과 체내역동학이 서로 유사하여 혈중에서 빠르게 제거되고 혈류량에 비례하여 장기, 특히 근육세포에 섭취된다. Tl-201의 심근세포에 섭취되는 기전은 주로 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성화에 의한다고 믿어지고 있고, thallium의 대사는 potassium 대사와 서로 연관성이 있어 실제로 동물 실험에서는 식이 중 potassium섭취를 증가시키면 정맥으로 투여한 thallium의 혈중제거가 늦어진다고 보고된 바 있다⁶. Tl-201은 Na⁺-K⁺ ATPase에 결합할 때 효소의 두 부위에 결합하여, 한 부위에 결합하는 potassium에 비하여 심근세포에서의 제거가 늦다고 한다⁷.

동맥혈관의 평활근세포는 혈관 벽의 탄력성을 유지하는데 매우 중요하며 한편으로는 동맥경화증의 발생에 중요한 세포로 알려져 있다. 그리고 당뇨병²⁰), 고혈압^{21,22}) 등에서 보고되는 Na⁺-K⁺ ATPase의 이상은 이들 질환에서 문제가 되는 혈관의 병변과 밀접한 연관이 있다고 사료되어 진다. 그러므로 저자들의 연구에서는 이러한 관점에서 표적세포로 생각되는 대동맥 평활근세포를 일차 배양하여 사용하였으며 이는 당뇨병, 고혈압 등의 연구에서 혈관 이상을 연구하는데 꼭 필요한 세포 중에 하나로 생각된다. 지금까지의 연구결과들은 당뇨병에서 볼 수 있는 고혈당은 Na⁺-K⁺ ATPase를 억제한다고 보고

하였다²⁰). $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase의 억제는 첫째로 혈관 세포막을 탈분극화시켜 전위의존 Ca^{++} 통로(voltage-dependent calcium channels)를 통하여 혈관 세포내 Ca^{++} 의 농도를 증가시키고, 둘째로는 세포질의 Na^+ 농도를 증가시켜 $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{++}$ 교환을 억제시키고, 세포내 Ca^{++} 농도를 증가시키며 혈관의 수축을 초래하고 당뇨병환자에서 고혈압을 유발시키는 원인이 된다. 저자들의 연구에서도 백서와 사람의 동맥혈관세포에서 고농도포도당은 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 약 30% 저하시켰으며 이는 Xia 등²³)이 Rb-86을 이용한 백서의 대동맥 평활근세포에서 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도는 고농도 포도당 배양액에서 감소하였다고 보고한 결과와 일치하는 소견이었다. 그리고 이러한 결과는 일반적으로 포도당 증가시 나타나는 protein kinase-C (PKC) 경로의 활성화를 통하여 나타나는 것이 아니고 세포질 phospholipase-A2의 증가로 인한 것이라고 하였다. 또 그들은 PMA투여에 의한 PKC의 직접 활성화는 오히려 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 증가시켰다고 보고하였다^{20,23}). 저자들의 연구에서도 Tl-201 및 Rb-86을 이용한 백서와 사람의 동맥혈관세포에서 측정된 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도는 PKC 자극제인 PMA를 투여하였을 때 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도가 25%정도 증가되어 Xia 등의 보고와 일치하였다. Sargeant²⁴) 등은 3T3-L1 세포에서 Rb-86을 이용한 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 측정하는 연구에서 insulin은 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 40% 증가시켰다고 발표하였다. 그리고 Tirupathur 등²⁵)은 A77 5 혈관 평활근세포에서 인슐린 투여 후 약 1시간에 α_2 subunit의 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase mRNA 표현을 증가되었다고 보고하였다. 저자들의 연구에서도 생리적 포도당농도에서는 인슐린 100 nM 투여 후 약 60%의 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도 증가를 볼 수 있었다. 이러한 저자들의 연구결과는 인슐린 투여시 생존된 심근세포내로의 Tl-201 섭취가 증가될 수 있다는 기존의 보고들^{10,11})과 생쥐의 해마에서 인슐린이 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 증가시킨다는 보고²⁶)와 유사하였고, 인슐린 주입시 심근세포내로의 Tl-201 섭취 증가되는 기전이 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도의 증가와 직접적인 연관이 있으리라 판단할 수 있었다. 그러나 GIK 용액과 같이 고농도 포도당에

인슐린을 첨가한 경우의 효과는 본 연구에서는 측정하지 않았으나, 향후 이에 대한 연구가 있어야 할 것이다. 또한 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 효소가 관여하는 세포 중 핵의학적으로 관심이 집중되어있는 심근세포도 동맥의 평활근세포와 유사한 결과를 보이리라 추측은 되나, 심근세포는 대량으로 배양하는 과정이 쉽지 않아 향후 추가적인 연구가 필요하리라 판단된다.

요 약

목적: 생물학적 성질이 potassium과 유사하고 핵의학분야에서 널리 이용되고 있으며 쉽게 구할 수 있는 Tl-201을 이용하여 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase의 활성도를 측정할 수 있는지를 알아보고자, 배양한 백서 대동맥평활근세포와 사람의 제대동맥 평활근세포에서 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase의 활성도를 측정하고, 기존의 Rb-86으로 측정된 방법과 비교하였다. 또한 Tl-201로 측정된 활성도에 대한 포도당, 인슐린 및 PMA의 영향을 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** Sprague-Dawley 백서의 흉부대동맥과 인체태반의 제대동맥에서 얻은 평활근세포를 배양하여 사용하였고, ouabain 첨가로 억제되는 Rb-86과 Tl-201의 섭취율을 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase에 의한 섭취율로 계산하여 활성도로 간주하였다. **결과:** 배양된 백서대동맥 평활근세포에서 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도는 고평도당배양액(22 mM) 상태에서 생리적 농도의 저포도당배양액(5 mM) 상태에 비하여 평균 28%의 저하를 보였으며, 인슐린 100 nM을 첨가하였을 때는 50%의 증가를 보였다. PKC 효소를 활성화시키는 PMA는 20%의 증가를 나타내었다. 인체제대동맥의 평활근세포에서도 유사한 변화를 보였다. Tl-201로 측정된 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase의 활성도치의 변화는 Rb-86을 이용한 측정에서도 동일하게 나타났다. **결론:** Tl-201을 이용하여 측정된 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도는 Rb-86을 이용한 측정치와 유사하여, Tl-201은 세포막 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도의 측정에 사용할 수 있으리라 판단된다. 인슐린과 PKC 효소 자극제는 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 활성도를 증가시키고, 고농도의 포도당은 활성도를 감소시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Sweadner KJ. Isozymes of the Na⁺-K⁺ ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1993;988:185-20.
- 2) Christensen HN. Role of amino acid transport and counter-transport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990;70:43-77.
- 3) Klip A. Action of insulin on Na⁺-H⁺ exchange. In: Grinstein S, editor. Na/H Exchange. Boca Raton: CRC; 1988. p. 285-303.
- 4) Moore RD. Effects of insulin upon ion transport. *Biochim Biophys Acta* 1983;737:1-49.
- 5) Rozengurt E, Heppel LA. Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive ⁸⁶Rb influx in quiescent 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:4492-5.
- 6) Gehring PJ, Hammond PB. The interrelationship between thallium and potassium in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 1967;155:187-201.
- 7) L'Abbate A, Biagini A, Michellassi C, Maseri A. Myocardial kinetics of thallium and potassium in man. *Circulation* 1979;60:776-85.
- 8) Clauser C, Macapinlac H, Healy J, Ghavimi F, Meyers P, Wollner N, et al. The relationship between thallium uptake, blood flow, and blood pool activity in bone and soft tissue tumors. *Clin Nucl Med* 1992;17:565-72.
- 9) Kaplan WD, Takuvorian T, Morris JH, Rumbaugh CL, Connolly BT, Atkin HL. Tl-201 brain tumor imaging: a comparative study with pathologic correlation. *J Nucl Med* 1987;29:46-52.
- 10) Tartagni F, Fallani F, Corbelli C, Balletta A, Franchi R, Lombardi A, et al. Detecting hibernated myocardium with SPECT and thallium-glucose-insulin infusion. *J Nucl Med* 1995;36:1377-83.
- 11) Wilson RA, Okada RD, Strauss HW, Pohost GL. Effect of glucose-insulin-potassium infusion on thallium myocardium clearance. *Circulation* 1983;68:203-9.
- 12) Nishiyama H, Sodd VJ, Adolph RJ, Saenger EL, Lewis JT, Gabel M. Intercomparison of myocardial imaging agents: ²⁰¹Tl, ¹²⁹Cs, ⁴³K, and ⁸¹Rb. *J Nucl Med* 1976;17:880-9.
- 13) Homareda H, Matsui H. Interaction of sodium and potassium ions with Na⁺, K⁺-ATPase. II General properties of ouabain-sensitive K⁺ binding. *J Biochem* 1982;92:219-31.
- 14) Matsui H, Homareda H. Measurement of binding of Na⁺, K⁺, and Rb⁺ to Na⁺, K⁺-ATPase by centrifugation methods. *Methods Enzymol* 1988;156:229-36.
- 15) Esmann M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺, K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. *Methods Enzymol* 1988;156:105-15.
- 16) Berrebi-Bertrand I, Maixent JM, Christe G, Lelievre LG. Two active Na⁺/K⁺-ATPase of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1021:148-56.
- 17) Norby JG. Coupled assay of Na⁺, K⁺-ATPase. *Methods Enzymol* 1988;156:116-9.
- 18) Norgaard A, Kjedsen K, Hansen O. Na⁺, K⁺-ATPase activity of crude homogenates of rat skeletal muscle as estimated from their K⁺-dependent 3-O-methylfluorescein phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta* 1984;770:203-9.
- 19) Stephen H, Klip A. Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* 1995;269(Cell Physiol 38):C295-311.
- 20) Greene DA, Lattimer SA. Protein kinase C agonists acutely normalize decreased ouabain-inhibitable respiration in diabetic rabbit nerve: implications for Na⁺-K⁺ ATPase regulation and diabetic complications. *Diabetes* 1986;35:242-5.
- 21) Rygielski D, Reddi A, Kuriyama S, Lasker N, Aviv A. Erythrocyte ghost Na⁺-K⁺ ATPase and blood pressure. *Hypertension* 1987;10:259-66.
- 22) Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. The role of sodium-potassium adenosine triphosphatase in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in spontaneously hypertensive rats: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens* 1997;10(12 Pt 1):1411-4.
- 23) Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase. *J Clin Invest* 1995;96:733-40.
- 24) Sargeant RJ, Liu Z, Klip A. Action of insulin on Na⁺-K⁺ ATPase and the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 1995;269:C217-C25.
- 25) Tirupattur PR, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. Regulation of Na⁺-K⁺ ATPase gene expression by

- insulin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 1993;6:626-9.
- 26) Bernstein NG, Poeggel G, Dorn A, Luppä H, Ziegler M. Insulin stimulates sodium-potassium-activated ATPase from rat hippocampus. *Experimentia* 1981;37:434-4.
-