

Halobacterium Halobium의 Membrane에서 Fluoxetine의 Partial Molar Volume에 관한 연구

김기준[†] · 정형학 · 김주한 · 송희준

대진대학교 공과대학 화학공학과

(2018년 2월 12일 접수; 2018년 3월 12일 수정; 2018년 3월 13일 채택)

A Study on Partial Molar Volume of Fluoxetine in Membrane of Halobacterium Halobium

Kim Ki-Jun[†] · Jeong Hyeon-Ghak · Kim Ju-Han · Song Hui-jun

Dept. of Chemical Engineering, Dae-jin University Pocheon 487-711, Korea

(Received February 12, 2018; Revised March 12, 2018; Accepted March 13, 2018)

요 약 : Halobacterium Halobium에서 항우울제의 부분 몰 부피와 몇 가지 지질의 부유물은 과량의 부피 팽창 계를 사용하여 25 °C에서 측정되었다. 일반적인 항우울제 인 Fluoxetine의 효능은 오랫동안 지질 용해도와 관련이 있는 것으로 알려져 왔다. Halobacterium Halobium의 보라색 막에서 유일한 막 단백질 인 소포의 변성은 280nm에서 흡수 변화에 의해 연구되었고 과도한 부피 팽창 계로 330nm에서 형광 변화를 보였다. 확산 교환에 의한 점성 중합체 용액의 1H NMR 분석은 측정을 위한 중요한 단계로, Halobacterium Halobium에서 Fluoxetine의 부분 몰 부피와 입자 크기는 양성으로 측정되었다. 항우울제는 낮은 사기와 우울증에 근거하여 다양한 인지 및 정신 증상을 유발하는 질병을 예방하여 일일 수행 능력을 저하시키는 걸로 나타났다.

주제어 : 항우울제, Halobacterium Halobium, 플루옥세틴, 부분 몰 부피 막, SNRI

Abstract : The partial molar volumes of an antidepressant in Halobacterium Halobium and in suspensions of several lipids have been determined at 25 °C it using a excess volume dilatometer. The potency of general antidepressant, Fluoxetine has long been known to correlate with lipid solubility. Denaturations of the vesicle, which is a sole membrane protein in the purple membrane of Halobacterium Halobium, were studied by absorption changes at 280 nm and fluorescence changes at 330 nm with excess volume dilatometer. The 1H NMR analysis of viscous polymer solutions by diffusion interchange is the important step by measurement. The partial molar volume and particle size of Fluoxetine in Halobacterium Halobium were measured to be positive. An

[†]Corresponding author
(E-mail: kjkim@daejin.ac.kr)

antidepressant can prevent diseases that produce a variety of cognitive and mental symptoms based on low morale and depression, resulting in poor daily performance.

Keywords : antidepressant, Halobacterium Halobium, fluoxetine, partial molar volume membrane, SNRI

1. 서론

우울증, 즉 우울장애는 의욕 저하와 우울감을 느끼는 주요 증상으로 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환을 말한다. 더구나 우울장애는 감정, 생각, 신체 상태, 그리고 행동 등에 변화를 일으키는 심각한 질환이다. 이는 다양한 정신 질환이 함께 나타날 수 있는데, 연구에 따르면 주요 우울 장애를 경험한 환자들의 대부분이 불안으로 인한 원인으로 고통받는다. 불안 증상의 악영향으로 심한 기능 손상 및 자살 시도 위험성을 증가시키는 요인이 된다. 또한 주요 우울 장애가 있는 환자들은 알코올을 포함한 물질의 중독 및 의존의 비율이 높으며, 주의력 결핍 과잉 행동 장애 및 외상 후 스트레스 장애의 공황 또한 높은 편이다.

또한 대략 세계 인구 중 8.5%의 사람들이 주요 우울 장애로 고통받고 있으며, 우울증이 나타나지 않는 연령대는 없는 것으로 알려져 있다. 심지어 엄마와 분리되어 있는 6개월 된 유아에서도 주요 우울증 증상이 발견되었다. 남자보다 여자가 우울 장애가 더 많이 나타나는 것으로 알려져 있다.

기분 부전 장애는 우울 장애와 비슷한 증상의 특징으로 기분 부전 장애의 진단 필수 기준 중 하나는 최소 2년 동안 우울한 기분이 없는 날보다 있는 날들이 더 많은 것인데, 이런 우울한 기분이 하루 대부분 지속되는 만성적인 특징이 있다. 소아는 최소 1년을 기준으로 삼는다. 또한 이 기간에 식욕의 변화, 수면의 변화, 피곤함, 자존심 저하, 집중력 감소 등의 증상 가운데 2가지 이상이 보이며, 최소 2년 동안 아무런 증상이 없는 기간이 2개월 이상 지속되어선 안 된다. 대부분의 경우 주요 우울 장애와 기분 부전 장애의 기준을 동시에 만족하면 주요 우울 장애로 진단하지만, 기분 부전 장애가 처음 발병해 2년 경과 후에 우울 장애가 나타난다.

기분 부전 장애의 증상적 특징은 주요 우울 장애와 유사한데, 기분 부전 장애에서는 흥미 및

즐거움의 전반적인 상실, 사회적 위축, 죄책감 또는 후회, 활동성 및 생산성의 저하 등이 더 흔히 나타난다. 반면에 수면, 식욕, 체중 변화, 정신운동성 증상들은 주요 우울 장애보다 덜 흔하게 나타난다.

따라서 뇌 신경과학의 방법론적 발달로 인해, 우울 장애의 생물학적 원인 규명이 많이 이루어지고 있다. 특히 우울 장애는 감정과 행동을 조절하는 중요한 신경 전달 물질인 세로토닌 신경계와 노르에피네프린 신경계의 기능 저하로 인해 생기며, 실제 이러한 신경계의 기능을 증강시켜주는 약물을 통해 증상이 호전된다.

우울 장애의 치료는 크게 약물 치료와 심리 치료로 나뉜다. 주로 공황장애 치료제로서 뇌내의 신경전달물질인 세로토닌과 노르아드레날린의 재흡수를 억제하는 항우울제인 SRI(serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor), SSRI(selective serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor), SNRI(serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor) 등 세로토닌 신경계 기능 증가 약물을 사용하며, 이 약물들이 효과가 있다는 여러 연구 발표가 있다. 심리 치료에는 인지 행동 치료, 대인 관계 치료, 행동 활성화, 문제 해결 치료 등 다양한 기법이 있으며, 개인 치료 및 집단 치료 등 형태도 다양하다. 우울 장애의 대표적인 심리 치료인 인지 행동 치료를 병행해야 한다.

인지 행동 치료는 우울증 치료 효과가 경험적으로 입증된 치료로서 널리 사용되고 있다. 인지 행동 치료는 우울증이 역기능적인 사고에 의해 매개되고 유지된다고 가정하는데, 치료의 주 목표는 우울증과 관련되는 역기능적 사고를 통하여 수정한다.

우울증으로 겪는 침체된 기분은 부정적인 생각으로 심각한 우울감과 더불어 삶의 흥미가 저하되고, 불안이나 불면, 식욕부진 등의 증상까지 동반되었으며, 자살을 시도한 사람의 3분의 2는 우울증 환자인 것으로 조사됐다.

그뿐만 아니라 우울증은 신체에도 악영향을 준

다는 연구결과가 나왔다. 스페인 그라나다 대학 연구팀이 3900여 명을 대상으로 연구를 한 결과, 우울증에 걸리면 환자 체세포에 산화 스트레스가 발생한다. 이것이 생체 산화 수준 균형을 무너뜨리면서 심혈관 질환이나 암 발생 확률이 높아진다는 사실이 밝혀졌다.

최근에 살아 있는 세포내에서 항우울제의 작용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 생물학적 거대분자가 생리적으로 수용액에서 활성적이고 지질-항우울제 상호작용은 살아 있는 세포내에서 항우울제 작용에 대한 부피변화를 이해하는데 필요하다[1,2]. 지질은 중성지질, 낫, 인지질 및 스테롤 등을 포함하고 있으며 생체안에서 영양분의 저장물질 또는 세포의 구성 성분으로 알려져 있다. 특히 인지질은 생체막의 주요 성분으로 막의 용질 투과성에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 지질은 수용액에서 Zwitterions으로 존재하고, 부피 변화는 전해질의 경우와 같이 지질과 항우울제가 구조적 상호작용을 하여 나타난다[3,4].

항우울제가 지질막에서 작용하는 부분의 생리적 작용과 특성은 잘 알려져 있지 않지만, Miller 등이 dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPC) 등의 지질에서 정량적으로 부피변화를 식 1에 의하여 제안하였다[5]. 항우울제가 작용하는 순수한 분을 팽창 E 는 다음과 같다.

$$E = \frac{V_2 \cdot X_2 \cdot P_2}{V_m} - \beta (P_t - 1) \quad (1)$$

위 식에서 V_2 는 항우울제가 작용하는 부분에서 항우울제의 분몰 부피이고, X_2 는 1기압 하에서 몰 분을 용해도 ($X_2 \ll 1$)를 의미하며, P_2 는 항우울제가 작용하는 부분의 부분압력을 나타낸다.

또한 V_m 는 몰 부피이고, β 는 등온 압축율이며, P_t 는 전체 압력을 의미한다.

본 연구에서 사용한 Halobacterium Halobium(HH)은 고농도의 염 용액에서 자라는 진핵 세포로서 미생물로부터 배양한 후 purple membrane(PM)과 red membrane(RM)을 분리하였다[5,6]. Purple membrane에 빛을 쬐어주면 광순환 회로를 돌게 되며, proton이 pumping되고, pH가 중성으로 변화된다. HH, PM, RM의 시료들을 교반하여 입자크기를 측정하였고, 이들 vesicle의 경우에 연속적으로 빛을 쬐어주면 proton의 이동방향은 vesicle의 내부에서 외부로 이동한다[7,8]. 항우울제에 대한 부피 변화는

excess volume dilatometer로 측정하여 각 성분물질의 소수성 부분과 친수성 부분의 차이에 의해 유발되는 부피변화의 영향을 측정한 결과 항우울제에 의한 Fluoxetine의 잉여부피는 감소하였으나, PM, HH과 RM의 잉여부피는 증가하였다.

2. 기기 및 실험 방법

자외선 및 가시광선 분광 광도계는 Varian 회사 제품의 Model Cary-17D를 사용하였으며, 30kHz 초음파기기, ultracentrifuger는 Beckman사 제품을 사용하였다. Beckman 온도계와 스위치가 부착된 항온조는 VWR Scientific사의 제품을 사용하였으며, 입자크기 분석은 Sedigraph 5000(model BI-DCP)을 이용하여 측정하였다. 항우울제인 Fluoxetine은 미국의 제약회사인 Watson PharmaceuticalsAldrich사에서 구입하였고, tris-base 등은 Sigma chemical사에서 구입했으며, pepton(Bacteriological Technical Bactor Agar)은 Difco Lab. 에서 구입하였다. 실험에서 사용한 dilatometer는 Duncan과 Sheridan[6]의 dilatometer를 이용하였다. Vesicle이 형성된 직접적인 확인은 300nm의 파장에서 turbidity로 확인하였다. 항우울제인 Fluoxetine은 일정한 농도로 맞추어 vesicle에 섞어 초음파처리하였다.

Vesicles은 일정한 양의 완충용액과 시료를 교반한 후에 초음파 처리한 다음 부피 변화를 측정하였다. 배지는 고온 고압하에서 배지 1 l 당 150 ml의 점종액으로 점종하였으며, 온도는 39 °C 로 유지하였고 150 rpm 으로 회전시켜 가면서 항온 하에서 인큐베이터에 5일 동안 키운 후에 원심분리 하였다[7].

완숙한 박테리아는 15분간 원심분리한 후 침전물을 기본 염용액에 넣고 0.1M NaCl 3 l 속에서 24시간 투석시켰다. 최종 침전물은 5 ml 탈이온 증류수에 넣고, 원심분리병 바닥에 60 % 설탕용액 1 ml를 넣은 후, 그 위에 30 ~ 50 % 까지 농도 범위에서 원심분리하였다. 따라서 DNA가 방출된 빨간 자주빛 침전물을 그 위에 붓고 15°C에서 원심분리 하면 PM은 평형에 도달하게 된다. 자주빛 띠와 바로 위에 빨강 띠가 생기는데 이것은 RM의 밀도가 1.16 g/cm³ 이고, PM의 밀도가 1.18 g/cm³ 으로 분별 원심분리법에 의하여 RM을 PM으로부터 분리하였다. 500 mg의 키토산을 pH 7.5, 0.01 M 인산 완충용액 혹은 트리스 완충용액 10 ml에 넣

고 vortexing한 후에 초음파 처리를 3분 간격으로 4번 반복하였다. 온도는 0 °C를 유지하고 초음파 처리 중에 용액에 질소를 불어 넣어 주었다[8]. 측정값을 이용하여 다음 식으로 partial molar volume을 측정하였다.

$$\bar{V}^E = \frac{n_3}{A + 1} (-\bar{V}_3^E + \bar{V}_4^E) \quad (10)$$

\bar{V}^E 와 n_3 로 부터 다음 식으로 유도된다.

$$\bar{V}_4^E = \frac{\bar{V}^E (A + 1)}{n_3} + \bar{V}_3^E \quad (11)$$

3. 결과 및 고찰

HH에 의해서 재구성된 여러 vesicle은 Sepharose 4B column을 통과시키면, 평균 크기가 250 Å 정도의 작은 unilamella 구조에 가까운 bilayer lipid vesicle에 Fluoxetine을 혼합한 시료의 스펙트럼은 Fig. 1과 같다. 자외선 및 가시광선에서 얻은 PM의 흡수 스펙트럼 Fig. 1에 의해서 농도가 7.4×10^{-5} M임을 알았다. 25 °C에서 측정된 각 용매들에서 Fluoxetine의 농도에 따른 partial molar volume 변화는 Table I와 같다. Fig. 1에서 Fluoxetine을 지질에 첨가함에 따라 약간 장파장 이동을 볼 수 있는데, 이는 지질에 항우울제가 첨가됨에 따라 Fluoxetine의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 전자 전이가 비극성 용매 효과에 의해 에너지 준위차가 감소하여 발생하는 현상이다[9]. PM에서 5×10^{-5} mol Fluoxetine의 partial molar volume은 3회 반복 측정된 평균값은 1.87 mL/mol이었으며, Fluoxetine의 몰 부피는 103.83 mL/mol이다. 이 값은 Miller

등이 측정하여 얻은 값들과 비교할 때 거의 유사하였다[12]. Table 1.에서 Fluoxetine+PM+Redmembrane의 partial molar volume이 가장 크게 나타났다.

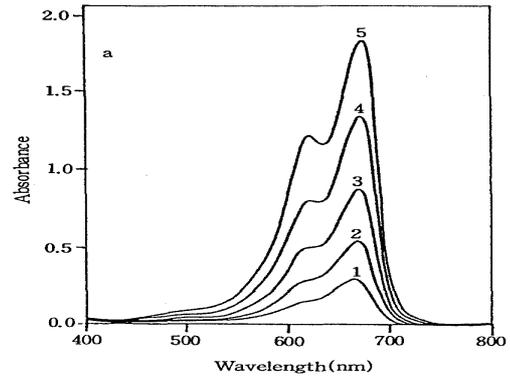


Fig. 1. The spectra of the Fluoxetine in Halobacterium Halobium.

Fig. 2는 각 시료를 vortexing한 후에 입자 크기를 (a) Halobacterium Halobium, (b) vesicle membrane, (c) Fluoxetine에 관해 측정된 결과 Halobacterium Halobium의 particle diameters가 가장 크게 나타났으나, Fluoxetine의 입자크기가 다르게 나타난 것은 이들과 비교하여 분자구조가 상이한 것으로 사료된다.

항우울제로 작용하는 Fluoxetine은 지질의 머리 부분 근처에서 작용하는 것으로 알려져 있는데, Fluoxetine과 vesicle은 지질의 소수성 영역으로 침투하고, 친수성 부분은 지질의 머리 부분인 아실기에 수소 결합을 한다[10]. 따라서 25 °C에서 측정된 각 용매들에서 Fluoxetine의 농도에 따른 부피 변화에서 항우울제는 전체적으로 부피변화 폭이 커짐을 알 수 있었다. Fig. 3에서 Fluoxetine은 전

Table I. Comparison of volume changes for Fluoxetine in Halobacterium Halobium at 25°C

PM		Fluoxetine		Fluoxetine+PM		Fluoxetine+PM+Red membrane	
\bar{V}^E	n_3	\bar{V}^E	n_3	\bar{V}^E	n_3	\bar{V}^E	n_3
(ml/mol)	(mol)	(ml/mol)	(mol)	(ml/mol)	(mol)	(ml/mol)	(mol)
7.9×10^{-6}	1.0×10^{-5}	8.4×10^{-6}	1.0×10^{-5}	8.8×10^{-6}	1.0×10^{-5}	9.6×10^{-6}	1.0×10^{-5}
8.4×10^{-6}	1.0×10^{-4}	9.7×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.07×10^{-5}	1.0×10^{-4}	1.7×10^{-5}	1.0×10^{-4}
9.03×10^{-6}	1.0×10^{-3}	1.08×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.02×10^{-4}	1.0×10^{-3}	2.6×10^{-4}	1.0×10^{-3}

신 항우울제로 비극성 물질이므로 아실기를 가진 머리 부분에서 반발력이 작용하고, 소수성 영역으로 투과가 잘 되어 부피 변화가 크게 나타난 것으로 생각된다.

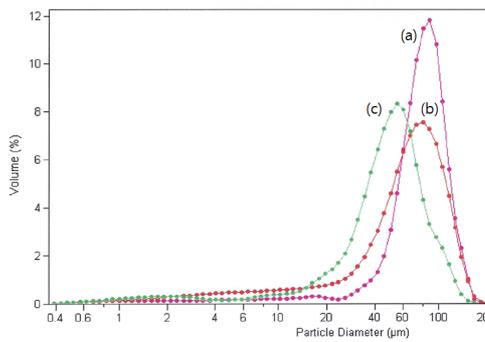


Fig. 2. The particle size analysis :
 (a) Halobacterium Halobium,
 (b) vesicle membrane,
 (c) Fluoxetine.

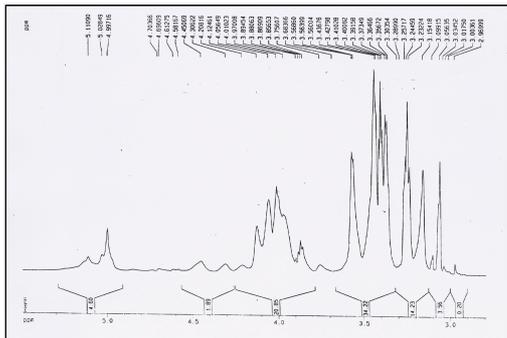


Fig. 3. Approximate chemical shifts for protons in various functional groups by 1H-NMR by Fluoxetine in vesicle.

Fig. 3에서 4.0ppm singlet 피크를 나타낸 것으로 OCH₃, CH₂의 chemical shift이고 3.5ppm, NH₂프로톤 피크이며, 4.997ppm NH₂CO, 3.15ppm CH₂-CH₂, 3.4ppm HN≡CH 3.36ppm HC=CH₂, 5.11ppm OH 결과로 나타낸 피크들이다.

Fendler는 Fluoxetine의 영향이 막 두께에 변화를 주지 않지만 PM은 RM보다 막 두께를 약간 증가시키는 효과가 있음을 발표하였고[11], Fluoxetine에 대하여 양의 partial molar volume을 나타내었다. 이 효과는 용액 부피가 용매와 용질

부피의 합보다 적기 때문에 생기는 electrostriction 현상이며 [12], 이는 전기장하에서 항우울제 자체를 극성인 물 분자가 둘러싸는 현상을 의미한다 [13-16]. 또한 Fluoxetine은 여러 종류의 지질을 포함하는 혼합물로서 2중, 3중 결합의 지질들은 cis - trans 형태로 꼬여 있어 packing이 잘 안되며, 소수성이 작아 부피 변화가 감소한 결과라고 생각한다. 극성물질과 비극성 물질의 원형질 막에 대한 투과는 극성인 물질이 결합을 형성하는 한쪽 음이온에 편재하여 분자가 쌍극자로 작용하며 머리 부분에 배열한 것으로 사료된다. 이는 Miller의 부피 변화를 측정한 결과와 본 실험과도 잘 일치하고 있으며, 항우울제에 의한 노르아드레날린의 재흡수를 억제하는 작용은 지질의 소수성 영역에 따른 부피 팽창과 상호관련이 있음을 확인한 것이다.

4. 결론

1. 항우울제인 Fluoxetine이 재구성된 양이 많을수록 흡광도가 크을 알 수 있었다.
2. Fluoxetine이 vesicle에 재구성된 시료에서 PM, HH, RM 순으로 partial molar volume이 감소하였다.
3. Vesicle에 Fluoxetine이 첨가되어 재구성된 상태에서 partial molar volume의 변화가 가장 크게 나타났다.
4. Fluoxetine은 vesicle제에 의한 음의 잉여부피를 나타냈으나 PM, HH과 RM은 양의 잉여부피를 나타냈다.

References

1. K. J. Kim, K. C. Sung, H. S. Lee. "J. Korean Eng. Chem", Vol. 11 No. 1, pp. 24-28. (2000).
2. Miller, K. W., Hammond, L. and Porter, E. G. "Chem. Phys. Lipids", Vol. 20, pp. 229-241. (1977).
3. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Bennett, P. B. and Shrivastav, B. B. "Mol. Pharmacol", Vol. 16, pp. 163-170. (1979).

4. Colley, C. M. and Metcalfe, J. C. "FEBS Lett", Vol. 24, pp. 241-246, (1972).
5. Smith, R. A., Porter, E. G. and Miller, K. W. "Biochim. Biophys. Acta", Vol. 645, pp. 327-338. (1981).
6. Franks, N. P and Leib, W. R. "Nature", Vol. 274, pp. 339. (1967).
7. Battino, R. "Chem. Rev". Vol. 71, pp. 5-45. (1971).
8. Pflug, H. D. and Benson, G. C. "Can. J. Chem". Vol. 46, pp. 287-294. (1968).
9. Duncan, W. A., Sheridan, J .P. and Swinto, J. L. "Trans. Faraday Soc.", Vol. 61, pp. 421, (1965).
10. Steeckenius, W., Rowen, R. "J. Cell Biol". Vol. 34, pp. 337-357. (1967).
11. Mullins, L. J. "Chem. Rev". Vol. 54 pp. 289-323. (1964).
12. Haydon, D. A., Hendry, B. M., Lerinson, S. R. "Biochim Biophys. Acta" Vol. 470, pp. 17-34. (1977).
13. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. "One hundred years after carcinoid", epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*; Vol. 26, No. 18, pp. 3063-3071, (2008).
14. Maggard MA, O'Connell JB, Ko CY. "Updated population-based review of carcinoid tumors. *Ann Surg* vol", Vol. 240, No. 1, pp. 117-122, (2004)
15. Zuetenhorst JM, Taal BG. Metastatic carcinoid tumors: a clinical review. "Oncologist". vol. 10, No. 2, pp. 123-132, (2005).
16. Boudreaux JP, Klimstra DS, Hassan MM, Woltering EA, Jensen RT, Goldsmith SJ, et al. "The NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors", well-differentiated neuroendocrine tumors of the Jejunum, Ileum, Appendix, and Cecum, Pancreas, Vol. 39, No. 6, pp. 755-767, (2010).