

사람적혈구막에서의 Calcium과 Suramin의 상호작용

연세대학교 의과대학 생리학교실

강 복 순 · 강 두 희

=Abstract=

Interaction of Calcium with Suramin in Human Red Cell Preparation

Bok Soon Kang, M.D. and Doo Hee Kang, M.D.

Department of Physiology Yonsei University College of Medicine

The trypanocidal drug suramin, an impermeant polyanion, has been shown to be a powerful inhibitor of the calcium uptake and calcium-stimulated ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (Fortes et al., 1974). In view of this finding, an attempt was made to investigate the effect of suramin on Ca^{2+} transport in resealed red cells and on Ca^{2+} -activated ATPase in red blood cell membrane fragments (RBCMF).

The results obtained are summarized as follows.

1. Ca^{2+} outflux from the resealed RBC was inhibited by suramin and the inhibitory action of suramin is proportional to the concentration of drug added inside the RBC preparation. When suramin is added both inside and outside the RBC preparation simultaneously, the magnitude of the inhibitory effect was more pronounced, suggesting that suramin inhibits both active Ca^{2+} outflux and Ca^{2+} - ^{45}Ca exchange diffusion across the RBC membrane.
2. Suramin inhibits the Ca^{2+} -activated ATPase of the RBCMF and the effect of inhibition by the drug was also concentration dependent.

From the above results, it may be concluded that suramin inhibits Ca^{2+} transport across RBC membrane by inhibiting Ca^{2+} -activated ATPase activity which has been known to be linked with active Ca^{2+} transport.

I. 서 론

Suramin(Antrypol, Bayer 205)은 일종의 polybasic anion으로써 trypanosomiasis 치료에 널리 사용되는 약물이다.

적혈구(Wilson 및 Wormall, 1949)와 yeast (Town 등, 1950)에서의 연구에 의하면 suramin은 세포막을 투과해 들어가지 못하나 시험관내에서의 여러가지 효소활동에는 현저한 영향을 미치고 있음이 보고되었다. 예컨대 여러가지 가수분해효소 및 산화효소의 기능 (Wills 및 Wormall, 1950) 그리고 뇌조직의 Na^{+} -stimulated ATPase, 적혈구막의 $(Na^{+}-K^{+})$ -activated ATPase의 활성도가 suramin에 의하여 억제됨이 보고되어 있다(Schwartz 등, 1962; Fortes 등, 1973). 그뿐만 아니라 Layton과 Azzi(1974)의 최근 보고에 의하면 골격근의 sarcoplasmic reticulum에서 calcium uptake와 calcium-stimulated ATPase 활성도 역시 suramin에 의하여 심한 억제를 받는다고 한다. 따라서 저자는 suramin이 적혈구막을 통한 Ca^{2+} 이동에도 영향을 미치는지 여부를 구명코져 본 연구에 착수하였다.

II. 실험방법 및 재료

1. Resealed 적혈구(RBC)의 제작 및 Ca^{2+} 이동의 측정

Resealed RBC의 제작은 Schatzmann 및 Vincenzi

* 본 논문은 1974년도 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의하여 진행되었음.

(1969)의 방법에 의하여 시행하였다. 즉 1mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM CaCl₂, 10mM NaCl, 10mM Tris (pH 7.4) 및 ⁴⁵CaCl₂ 0.04μci/ml 가 들어있는 용혈용액(lysing solution) 50ml 에 사람의 RBC 15ml 를 넣어 저어주면서 135초간 실온에 두었다가 3M KCl 일정량을 첨가하며 등장성 용액이 되게하여 5분간 실온에 두어 resealed 한 다음 10,000×g 로 0°C 에서 10분간 원심분리하였다 침전된 RBC 를 2mM MgCl₂, 2mM ATP, 1mM CaCl₂, 140mM NaCl, 10mM KCl, 및 10mM Tris(pH 7.4)로 구성된 incubation 용액으로 2회 세척하고 incubation 용액과 resealed RBC 를 1:1 비율로 희석하여 50ml 삼각후라스크에 넣어 37°C에서 incubation 하였다. Incubation 기간중 RBC로부터 Ca⁴⁵이 이동되어 나오는 정도를 측정하기 위하여 0, 1, 2, 5, 10, 20분 간격으로 incubation 용액 일정량을 취하여 10,000×g 에서 10분간 원심분리후 그 상층액중의 ⁴⁵Ca activity 를 측정하였다. 즉 상층액 50μl 를 counting vial 에 넣고 건조시킨 다음 scintillation 용액 10ml 를 가하여 혼합후 Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer (Model, 3320, Packard Instrument Co., Inc.)에 의하여 측정하였다.

Suramin 은 resealed RBC 제작시 용액내에 첨가하여 RBC 내의 suramin 농도가 2.5, 5.0, 10.0, 30.0 및 50.0μM 되게 하였다. 또 어떤 실험에서는 incubation medium 에 suramin 을 동시에 1mM 농도로 첨가하여 그 영향을 관찰하였다.

2. 적혈구막소편(RBCMF)의 제작 및 Ca⁴⁵-activated ATPase 활성도의 측정

적혈구막소편의 제작은 Rosenberg 및 Guidotti (1968)의 방법에 의하여 시행하였다. 즉 신선한 사람의 혈액을 실온에서 3,000×g 로 10분간 원심분리하여 얻은 RBC 를 0.9% NaCl 로 3회 그리고 100mM MgCl₂ 및 1mM EDTA 로 구성된 용액으로 1회 세척하여 실온에서 3,000×g 로 10분간 원심분리후 침전된 RBC 에 냉각된 15 mOsm Tris-HCl(pH 7.4)를 RBC 용적의 30배가량 가하여 용혈시킨다음 0°C 에서 10,000×g 로 15분간 원심분리후에 그 상층액을 버리고 RBC ghost 를 채취하여 15 mOsm Tris-HCl 및 1mM EDTA 로 구성된 용액으로 2회 그리고 15 mOsm Tris-HCl 로 3회 세척하여 적혈구막소편을 얻었다 RBC ghost 의 세척은 ghost 와 각 용액의 혼합액을 0°C 에서 10,000×g 로 15분간 원심분리함으로써 시행하였다.

이와같이 얻은 적혈구막소편은 먼저 그 단백질함량

을 측정후(Lowry, 1951) Ca⁴⁵-activated ATPase 활성도 측정에 사용하였다.

Ca⁴⁵-activated ATPase 의 활성도는 적혈구막소편을 incubation 용액에 넣고(1mg protein/ml) 37°C 에서 5분간 preincubation 한후 2mM ATP 를 첨가하여 30분간 incubation 하는 동안에 유리되는 inorganic phosphate(Pi)의 양을 측정하였다. 즉 30분 incubation 한후 20% trichloroacetic acid 1ml 를 가하여 반응을 정지시키고 얼음에 담그어 냉각시킨후 실온에서 3,000×g 로 10분간 원심분리하여 상층액내에 유리된 inorganic phosphate 양을 Fiske-Subbarow (1929)의 비색법에 의하여 측정하였다.

Incubation 용액은 total ATPase (즉 Mg⁴⁵-ATPase + Ca⁴⁵-ATPase) 측정시는 20mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 2mM ATP 그리고 30mM Tris-buffer (pH 7.4)를 포함하고 있었으며 Mg⁴⁵-ATPase 측정시에는 0.5mM CaCl₂ 대신 5mM EGTA 로 대체하였다. Ca⁴⁵-ATPase 활성도는 total-ATPase 와 Mg⁴⁵-ATPase 의 차를 취하므로써 산출하였으며 μmoles Pi/g protein/hr 로 나타내었다. Ca⁴⁵-ATPase 활성도에 미치는 suramin 의 영향은 incubation 용액내에 suramin 을 첨가했을때의 효소활성도를 대조군의 그것과 비교함으로써 관찰하였다.

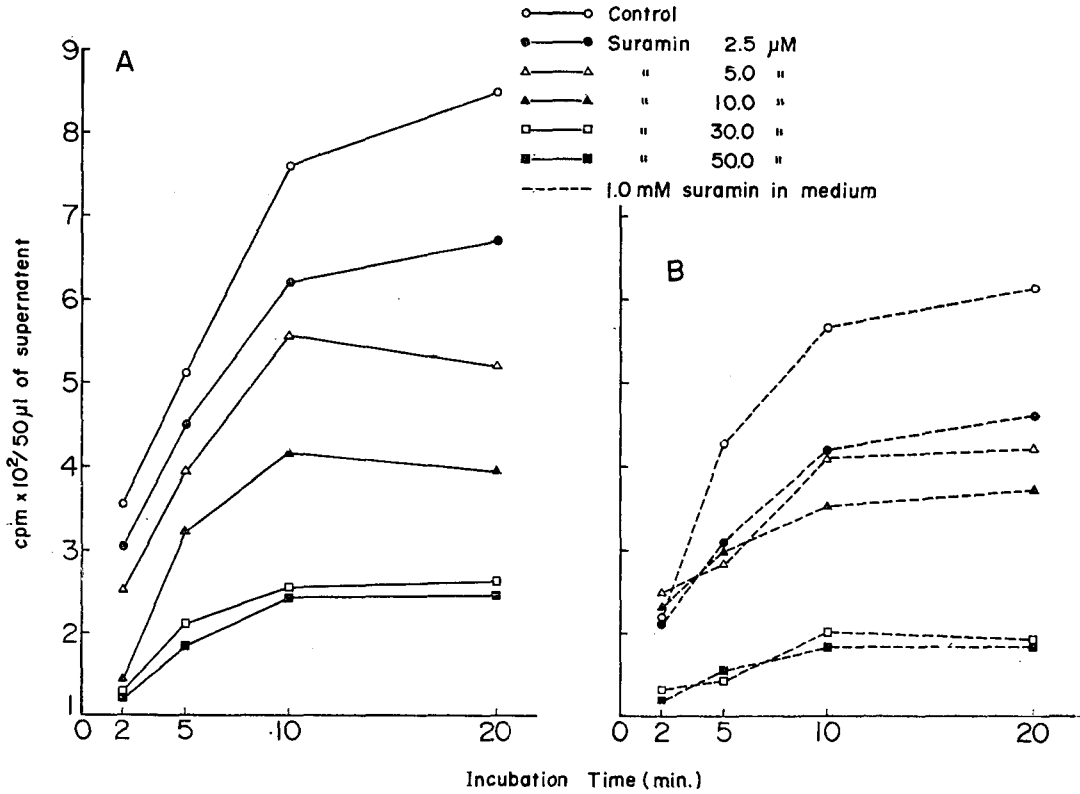
III. 실험성적

1. Resealed RBC 에서의 Ca⁴⁵ 이동에 미치는 suramin 의 영향

계 1 도는 ⁴⁵Ca 를 포함하고 있는 resealed RBC 를 ⁴⁵Ca 가 없는 용액중으로의 ⁴⁵Ca 의 이동에 미치는 suramin 의 영향을 나타낸 것이다.

계 1 도A에서 보는 바와같이 resealed RBC 내에 suramin 의 존재여부를 막론하고 처음 10분간 incubation 용액내의 방사능은 급격히 증가하여 10분후에는 대체로 평형상태에 이르게되는데 평형상태때의 용액내의 방사능은 resealed RBC 내의 suramin 농도가 증가함에 따라 낮아졌다. 즉 incubation 10분대의 용액내 방사능을 대조군에 대한 100분율로 표시하면 suramin 농도가 2.5μM 일때 81.8%, 5.0μM 일때 73.7%, 10.0μM 일때 54.9%, 30.0μM 일때 32.9%, 그리고 50μM 일때 32.7%로써 현저한 suramin 의 영향을 나타내었다.

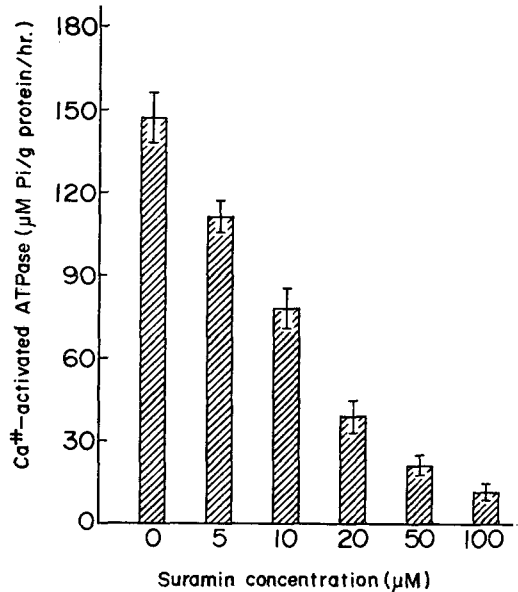
그런데 resealed RBC 제작시 첨가된 ⁴⁵Ca 의 양은 모든 실험군에서 동일하였으므로 incubation 시행전 re-



제 1 도 Effect of suramin on Ca²⁺ outflux from resealed RBC.

sealed RBC 내의 ⁴⁵Ca 량 역시 모든 실험군에서 동일하다고 가정할 수 있으며 따라서 상기와 같은 결과는 Ca²⁺의 이동이 suramin에 의하여 억제되며 또 그 억제 정도는 suramin 농도에 비례함을 나타낸다고 하겠다.

한편 incubation 용액 역시 1mM의 suramin을 동시에 포함하고 있을때는(제 1 도 B) resealed RBC 내에만 suramin을 포함시켰을 때와 유사한 양상으로 처음 10분간은 용액내의 방사능이 시간에 따라 증가하다가 10분후에는 평형상태에 도달하였으나 평형상태때의 용액내 방사능은 전자(resealed RBC 내에만 suramin이 포함했을 때)보다 현저히 낮았다. 그런데 resealed RBC 내에 suramin을 포함하지 않은 군에서는 대조군에서보다 용액중의 방사능이 낮았으며 이는 suramin이 세포외에 존재할때는 외부의 Ca²⁺과 내부의 ⁴⁵Ca 간의 exchange를 억제함을 나타낸다고 하겠다. 따라서 상기결과는 suramin이 세포막 양쪽에 모두 존재할때는 막일측에 존재할때에 비하여 ⁴⁵Ca의 outflux를 더욱 억제함을 나타낸다고 볼 수 있다.



제 2 도 Effect of suramin on Ca²⁺-activated ATPase of RBCMF.

2. RBCMF 에서의 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도에 미치는 suramin 의 영향

제 2 도는 RBCMF 에서의 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도와 이에 미치는 suramin 의 영향을 나타내는데 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도는 대조군에서 $148.6 \pm 9.1 \mu\text{moles Pi/g protein/hr}$ 이었으나 용액내에 suramin 을 5, 10, 20, 50 및 $100 \mu\text{M}$ 농도로 첨가하였을 때는 각각 114.6 ± 5.4 , 79.6 ± 8.9 , 39.3 ± 8.4 , 19.0 ± 2.1 및 $10.7 \pm 1.7 \mu\text{moles Pi/g protein/hr}$ 로서 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도는 suramin 의 농도가 증가함에 따라 점차 감소됨을 나타내었다($p < 0.001$).

IV. 고 찰

본실험에서는 임상에서 trypanosomiasis 치료에 널리 사용되고 있는 suramin 이 RBC 막을 통한 Ca^{2+} 이동에 미치는 영향을 관찰하였던바 resealed RBC 내에서 용액으로 이동되는 ^{45}Ca 의 양은 RBC 내에 첨가된 suramin 의 농도에 비례하며 감소되었고, 이와같은 ^{45}Ca 이동의 억제양상은 RBC 막 외부 incubation 용액에 suramin 을 첨가함으로써 더욱 현저함을 알 수 있었다.

그런데 RBC 막을 통한 Ca^{2+} 이동이 suramin 에 의하여 억제되는 현상은 다음과 같은 기전에 의한 것으로 생각된다.

즉 막에서 Ca^{2+} 을 능동적으로 이동시키는 carrier 는 Ca^{2+} -activated ATPase 라고 생각되고 있는데(Schatzmann 및 Rossi, 1971; Cha 등, 1971) 실제로 본실험에서 적혈구막소편에서의 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도가 suramin 에 의하여 현저히 억제되는 것으로 보아 resealed RBC 에서의 Ca^{2+} 의 능동적 이동은 이효소계가 Ca^{2+} 의 이동에 의하여 억제된 결과라고 생각된다.

RBC 내부와 외부 양측에 suramin 을 첨가시켰을 때는 RBC 내부에만 첨가시켰을 때에 비하여 ^{45}Ca 의 이동량은 더욱 현저히 감소되었는데 이는 아마도 suramin 이 RBC 막을 통한 Ca^{2+} 의 능동적 이동뿐만 아니라 ^{45}Ca 와 Ca^{2+} 의 exchange diffusion 까지도 억제한 것으로 생각된다.

이와같이 suramin 이 ATP-requiring enzyme 인 ATPase 활성도를 억제함으로써 세포막을 통한 cation 들의 이동을 저해한다는 사실은 여러 연구자들에 의하여 보고된바 있다.

즉 Schwartz 등(1962)은 guinea pig 의 뇌조직에서 Na^{+} -stimulated ATPase 활성도가, Fortes 등(1973)은

resealed RBC 에서 $(Na^{+}-K^{+})$ -activated ATPase 활성도가 suramin 에 의하여 억제됨으로서 Na^{+} 및 K^{+} 의 이동이 억제되었다고 보고하였고 Layton 과 Azzi(1974) 는 골격근의 sarcoplasmic reticulum 에서 calcium uptake 및 Ca^{2+} -stimulated ATPase 활성도가 suramin 에 의하여 현저히 억제되었으며 suramin 의 작용부위는 세포내부에 있음을 시사하였다.

Suramin 은 naphthylamine group 에 세개의 sulphonic acid 를 가지고 있는 urea 유도체이며 hemoglobin 을 위시한 기타 여러종류의 단백질과 결합하여 suramin-protein complex 를 형성하는데 이때 그 결합부위는 suramin 의 naphthylamine-sulphonic acid 와 단백질의 basic group 이 서로 결합한다고 하며(Bournnell 등 1939; Dewey 및 Wormall, 1946; Wilson 및 Wormall 1949; Town 등 1950) 또 적혈구막소편에서 수동적인 Ca^{2+} 결합이 suramin 에 의하여 증가된다는 실험성적(미발표)들을 미루어 RBC 내에 첨가된 suramin 이 hemoglobin 또는 그의 cellular component 와 결합하고, 여기에 Ca^{2+} 이 결합하며 혹종의 복합체(complex) 를 형성함으로써 실제로 RBC 내 free Ca^{2+} 의 감소를 초래하고 따라서 RBC 내에서 용액으로 이동되는 Ca^{2+} 의 양이 감소될 가능성도 있을 것으로 생각되는 바이다.

V. 결 론

적혈구막을 통하여 Ca^{2+} 이 이동될때 이에 미치는 suramin 의 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Resealed RBC 내에 첨가된 suramin 은 RBC 내부에서 외부로의 능동적 Ca^{2+} 이동을 억제하였으며 이 억제현상은 suramin 이 RBC 막 양측에 동시에 있을때 더욱 현저하였으며 이는 Ca^{2+} 의 exchange diffusion 도 억제하였음을 시사한다.

2. Suramin 은 적혈구막소편 (RBCMF)에서의 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도를 억제하였다.

이상의 성적으로 보아 suramin 은 RBC 막에서 Ca^{2+} 의 능동적이동에 중요역할을 하는 Ca^{2+} -activated ATPase 활성도를 감소시킴으로서 Ca^{2+} 이동을 억제한 것이라고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bournnell, J.C., W.G. Dangerfield and A. Wormall.: *Studies on Bayer 205(Germanin) and Antrypol: Further observations on method of*

- determination and on retention of this drug in animal body. *Biochem. J.* 83:81, 1939.
- 2) Cha, Y.N., C.S. Bak and K.S. Lee.: *Active uptake of Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase in red cell membrane fragments.* *J. Gen. Physiol.* 57:202, 1971.
 - 3) Dewey, H.M. and A. Wormall.: *Studies on suramin (Antrypol: Bayer 205): Combination of drug with plasma and other proteins.* *Biochem. J.* 40:119, 1946.
 - 4) Fiske, C.H. and Y. Subbarow.: *Phosphocreatine.* *J. Biol. Chem.* 81:629, 1929.
 - 5) Fortes, P.A.G., J.C. Ellory and V.L. Lew.: *Suramin: A potent ATPase inhibitors which acts on the inside surface of the sodium pump.* *Biochim. Biophys. Acta.* 249:606, 1971.
 - 6) Layton, D. and A. Azzi, Suramin.: *A potent inhibitor of the calcium transport in sarcoplasmic reticulum.* *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 59:322, 1974.
 - 7) Lowry, O.H., N.J. Resebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall.: *Protein measurement with Folin phenol reagent.* *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
 - 8) Rosenberg, S.A. and G. Guidotti.: *The protein of human erythrocyte membranes. 1. Preparation, solubilization, and partial characterization.* *J. Biol. Chem.* 243:1985, 1968.
 - 9) Schatzmann, H.J. and G.L. Rossi.: *$(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -activated membrane ATPase in human red cells and their relations to cation transport.* *Biochim. Biophys. Acta.* 241:379, 1971.
 - 10) Schatzmann, H.J. and F.F. Vincenzi.: *Calcium movements across the membrane of human red cells.* *J. Physiol.* 201:369, 1969.
 - 11) Schwartz, A., H.S. Bachelard and H. McIlwain.: *The sodium-stimulated adenosine-triphosphatase activity and other properties of cerebral microsomal fractions and subfractions.* *Biochem. J.* 84:626, 1962.
 - 12) Town, B.W., E.D. Wills, E.J. Wilson and A. Wormall.: *Studies on suramin. 8. The action of the drug on enzymes and some other proteins. General considerations.* *Biochem. J.* 47:149, 1950.
 - 13) Wills, E.D. and A. Wormall.: *Studies on suramin. 9. The action of the drug on some enzymes.* *Biochem. J.* 47:158, 1950.
 - 14) Wilson, E.J. and A. Wormall.: *Studies on suramin (Antrypol: Bayer 205). 7. Further observations on the combination of the drug with proteins.* *Biochem. J.* 45:224, 1949.