大韓藥理學會誌 : 第18卷 第2號
Korean J. of Pharmacology
Volume 18, Number 2, 1982

# 가토 적혈구 세포막 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성에 미치는 Carbachol의 영향

서울대학교 약학대학 약효학교실 및 *의과대학 약리학교실

**김옥진 · 김낙두 · 박찬웅* · 홍사악***

**=Abstract=**

**The Effect of Carbachol on $Na^+$, $K^+$-ATPase Activity in Rabbit Erythrocyte Membrane**

**Ok Jin Kim, Nak Doo Kim, Chan Woong Park* and Sa Ack Hong***

*Department of Pharmacology, College of Pharmacy and *Department of Pharmacology College of Medicine, Seoul National University*

$Na^+$, $K^+$-ATPase is a component of plasma membrane in almost all animal cell, and maintains ionic distribution and membrane potential of normal cell.

In the mechanism of adrenergic transmission, it is relatively well known that drug-receptor combination leads to stimulate adenylate cyclase and so on.

In the cholinergic transmisison, the mechanism is not well known but is simply interpreted as the change of membrane permeability results from acetylcholine receptor interaction.

To study the relationship between cholinergic transmission and membrane $Na^+$, $K^+$-ATPase, the effect of carbachol on $Na^+$, $K^+$-ATPase activity in rabbit erythrocyte membrane is studied.

The results are summarized as follows.

1) Total ATPase, $Mg^{+2}$-ATPase and $Na^+$, $K^+$-ATPase of rabbit erythrocyte membrane show maximum activities at 1 mM of tris-ATP.

2) Total ATPase activity tends to increase when treated with carbachol($10^{-9}$M-$10^{-3}$M).

3) The $Mg^{+2}$-ATPase activity also tends to increase when treated with carbachol($10^{-9}$M-$10^{-3}$M).

4) The $Na^+$, $K^+$-ATPase activity is inhibited when treated with carbachol($10^{-9}$M-$10^{-7}$M).

It is suggested that the inhibition of $Na^+$, $K^+$-ATPase by cholinergic drugs may be considered as one part of mechanism of cholinergic transmission.

## 서 론

대부분의 동물세포는 낮은 $Na^+$농도와 높은 $K^+$농도의 세포내 환경을 유지하고 있으며 이것은 높은 $Na^+$농도와 낮은 $K^+$농도의 조성을 가진 배지내에 존재할 때에도 유지된다[1].

세포막은 $Na^+$에 대하여 극히 낮은 투과성을 갖고 있으나 $K^+$에 대하여는 높은 투과성을 갖고 있어서 세포내안정전압은 세포외에 비하여 전기적으로 음성을 나타낸다.

이러한 세포막을 통한 양 ion의 농도차와 전압차를

본 연구는 서울대학교 의과대학 동창회 학술연구재단 RC-80-1의 지원으로 이루어 졌음.

유지하는 데에는 sodium pump가 중요한 역활을 하는 것으로 알려져 있으며 그 작용방식은 1 mole의 ATP가 가수분해되는 에너지를 이용하여 3 mole의 $Na^+$ ion이 전기화학적 경사에 역행하여 세포 밖으로 이동하고 이와 수반하여 2 mole의 $K^+$ ion이 전기적 경사에 따라 그러나 화학적 경사에 역행하여 세포내로 들어 오므로[2~4] 하나의 net positive charge가 세포 밖으로 이동하게 되어 전기적 성질을 띄게되며 이러한 전기적 성질로 말미암아 여러 조직에서 각각 다른 안정시 막전압을 유지하게 된다.

이러한 능동수송은 신경, 근, 뇌등의 excitable cell 외에도 개구리 피부, 적혈구, 신장등의 많은 조직에서도 이미 밝혀져 있으며 1957년에 Skou[5]가 crab nerve homogenate의 microsomal component에서 ATPase 활성을 관찰하고 $Mg^{+2}$존재하에 $Na^+$과 $K^+$을 가하므로써 activity가 증가함을 보고하였고, Schatzman이 적혈구에서 $Na^+$의 세포외로의 이동과 $K^+$의 세포내로의 이동을 관찰하고 이와같은 ion이동이 강심배당체에 의하여 억제됨을 보고 하였으며[6] Dunham과 Glynn에 의하여 ATPase활성도가 alkali금속 ion의 능동수송과 관련되어 있음을 보고한 이래[7] Sodium pump와 세포막 ATPase간의 관련성이 많이 밝혀졌고[8] 최근에는 순수분리된 $Na^+$, $K^+$-ATPase와 인지질로 부터 재구성된 vesicle을 이용하여 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 sodium pump라는 것이 증명되었다[9~11].

그동안 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 많은 연구에도 불구하고 그 상세한 molecular mechanism은 밝혀져 있지 않으나 $Na^+$과 $K^+$의 능동수송에서의 불평등으로[12] 말미암아 전기적 성질을 띄게되고 charge의 net movement를 초래하게 된다는 사실은 이미 여러 보고들에서도 설명되고 있다.

즉, 많은 excitable tissue들에 있어서 계속적인 자극에 의해 강축을 일으켜서 세포내 $Na^+$농도를 증가시키거나 $Na^+$의 injection, 또는 $K^+$-free, $Na^+$-rich 용액에 저장하거나 하여 세포내 $Na^+$농도를 증가시켰을 때 ouabain에 민감한 과분극이 일어남이 보고되었다[13~18].

그러나 이러한 과분극이 단지 sodium pump의 활성도 증가에 의한 것인지에 대해서는 의문이 따르고 있지만[19,20] Thomas[17]에 의하면 voltage clamped snail ganglion에서 $Na^+$을 iontophoresis 한 후 $Na^+$ pumping에 의하여 생성되는 외향전류는 구축된 $Na^+$ ion에 의하여 생성되는 total charge의 1/3~1/4에 해당한다고 보고하고 있으므로 2 mole의 $K^+$ ion 유입에 대한 3 mole의 $Na^+$ ion의 유출과 이에 수반된 net charge movement를 확인할 수 있으며 Kostyuk등은 sodium pump에 의하여 생성되는 전류는 막전압에 따라 그 크기가 변하며 막이 과분극되었을 때에는 pump에 의하여 생성되는 전류가 매우 적다고 보고하고 있고[16], pump에 있어서의 $Na^+$과 $K^+$의 결합비도 변할 수 있어서 세포내의 $Na^+$농도에 따라 $Na^+/K^+$의 비가 3 : 1에서 1 : 1로 감소될 수도 있다고 하고있다[21,22].

이러한 사실로 미루어 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 세포막의 분극—탈분극에 관여하리라는 것은 충분히 짐작할 수 있다.

한편 cholinergic transmission에 있어서는 그 기전이 명확히 밝혀져 있지 않고 일반적으로 세포막 투과성의 변화를 초래한다는 설명만을 하고 있다[23].

즉 acetylcholine 및 그 유도체를 투여하여 muscarine 性 또는 nicotine 性 흥분을 일으켰을 때 세포막 탈분극을 일으키며 이때 $Na^+$, $K^+$의 투과도가 변하는 것을 볼 수 있고 choline性 억제의 경우에도 ion투과도의 변화를 초래하는 것을 볼 수 있다[24].

세포막 막전압 유지 및 탈분극에 있어서 $Na^+$, $K^+$-ATPase의 역할은 잘 알려진 바 있어 저자는 cholinergic transmission에서의 ion투과도 변화와 탈분극에 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 관여하는가를 알아보기 위하여 muscarinic receptor agonist인 carbachol을 이용하여 적혈구 세포막 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1) 적혈구 세포막 ATPase 제작

체중 2 kg 이상의 가토를 性의 구별없이 secobarbital로 마취시킨 후 heparin(5,000U/100 ml)을 항응고제로 하고 외경동맥에 cannula를 삽입하여 채혈하였으며 Bond와 Gren[25]의 방법에 준하여 세포막을 분리하였다.

이때 모든 조작은 4°C 이하에서 하였다.

즉 全血을 200×g로 10분간 원심분리하여 plasma를 제거하고 0.16 M tris-HCl(pH 6.8) 6 volume으로 3번 씻어내어 적혈구 위층의 white buffy layer를 제거한 후 1 mM tris-EDTA(pH 7.5) 5~10 volume으로 용혈시켰다.

이때 용혈용액은 주사기를 통해 힘주어 가함으로써 전 적혈구가 잘 섞여 용혈되도록 하였다. 용혈된 적혈구를 10분간 방치시킨 후 1,800×g에서 20분간 원심

분리하여 상등액을 흡인하여 버리고 침전물을 1 mM EDTA, 10 mM tris-HCl(pH 7.5)의 용액으로 수회 씻어내어 혈색소를 제거함으로써 세포막 표본이 거의 흰색을 띄도록 하였다.

이렇게 하여 얻은 세포막을 10 mM imidazole HCl (pH 7.2)에 suspension하여 Lowry[26]등의 방법으로 단백질양을 측정하여 −20°C에서 저장하였다.

### 2) ATPase 활성도 측정

실험은 반응액의 조성을 NaCl 110 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, imidazole HCl 30 mM로 하고 단백질양을 0.25~0.3 mg/ml되도록 하여 시험관 내에서 시행하였다.

반응은 37°C항온수욕조에서 10분간 전처치한 후 tris-ATP를 기질로 넣었을 때부터 시작하여 30분간 반응시켰으며 15% trichloroacetic acid를 가함으로써 반응을 종료시켰다.

이 반응액을 원심분리 후 상등액의 유리 Pi의 양을 Horwitt[27]의 방법에 의하여 파장 660 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 optical density를 측정하였으며 ATPase activity를 m $\mu$mole/mg protein/hr의 단위로 표시하였다.

이때 표준 반응액의 ATPase활성도를 total ATPase activity로 하고 ouabain $10^{-3}$g/ml을 사용하여 $Na^+$, $K^+$-ATPase를 억제시켰을 때의 활성도를 $Mg^{++}$-ATPase activity로 하였으며 전자에서 후자를 제한 양을 $Na^+$, $K^+$-ATPase activity로 표시하였다.

### 3) 시 약

① tris-ATP의 제조[28]: AG 50W-X 8 resin 40 Gm을 0.4 N HCl 40 ml에 넣고 5분간 진탕한 다음 상등액을 따라낸 후 증류수로 다시 5분간 진탕하여 상등액을 따라 버리는 방법으로 상등액 pH가 5.2가될때까지 증류수로 계속 씻었다.

이렇게 얻은 resin은 진공펌프로 흡인 여과하여 건조시켰다.

$Na_2$ ATP 8 Gm을 증류수 25 ml에 용해시킨 후 마른 resin에 가하여 15분간 교반한 다음 흡인여과하고 다시 resin에 5 ml의 증류수를 가하여 씻어 흡인여과하여 여액을 합하였다.

이 여액은 pH가 6.8이 되도록 tris salt로 적정하여 tris ATP를 얻었고 spectrophotometer를 사용하여 259 nm에서 흡광도를 측정하여 molar absorbancy를 이용하여 농도를 구하였고 −20°C에서 저장하였다. 모든 조작은 냉각상태에서 행하였다.

② 기타 시약은 Sigma 및 Merk 회사제의 시약용을 사용하였고 모든 시약은 3차 증류수를 사용하여 만들었다.

## 실 험 결 과

### 1) 가토 적혈구 세포막 ATPase activity에 대한 tris-ATP의 영향

Total ATPase, $Mg^{+2}$-ATPase, $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도는 모두 tris-ATP 농도를 증가시켜감에 따라 점차 증가하였으며 tris-ATP 농도가 1 mM이상일 때 최대 활성도를 나타내었고 1.5 mM까지 대개 plateau를 이루었다.

Total ATPase activity는 최대 661m $\mu$mole Pi/mg protein/hr를 나타내었으며 $Mg^{+2}$-ATPase는 최대 358 m $\mu$mole Pi/mg protein/hr를 나타내었다. $Na^+$, $K^+$-ATPase activity는 최대 313 m $\mu$mole Pi/mg protein/hr를 나타내어서 total ATPase activity의 약 47%에 해당하였다(Table 1).

### 2) Total ATPase activity에 미치는 carbachol의 영향

Table 2는 total ATPase활성도에 미치는 carbachol의 영향을 나타내고 있다.

**Table 1.** ATPase activity of rabbit erythrocyte membrane (m $\mu$moles Pi/mg protein/hr)

| ATP conc. | Total ATPase | $Mg^+$-ATPase | $Na^+$,$K^+$-ATPase |
|---|---|---|---|
| 0.1 mM | 309.46±31.38* | 216.18±29.56 | 93.27±35.31 |
| 0.5 mM | 520.31±43.70 | 340.55±18.53 | 179.76±31.08 |
| 1.0 mM | 660.99±59.99 | 357.87±36.89 | 303.13±30.19 |
| 1.5 mM | 650.99±65.27 | 337.93±53.97 | 313.06±35.68 |

*: Mean±S.D.

**Table 2.** The effect of carbachol on Total ATPase activity (m $\mu$moles Pi/mg protein/hr)

| ATP conc. \ Carbachol conc. | Control | $10^{-9}$M | $10^{-7}$M | $10^{-5}$M | $10^{-3}$M |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 mM | 309.46±31.38* | 286.86±40.66 | 328.51±45.77 | 378.74±43.06 | 359.18±53.85 |
| 0.5 mM | 520.31±43.70 | 502.50±67.81 | 507.86±62.09 | 560.94±27.41 | 531.53±72.33 |
| 1.0 mM | 660.99±59.99 | 672.38±49.33 | 669.09±32.81 | 671.45±198.65 | 692.86±68.36 |
| 1.5 mM | 650.99±65.27 | 711.74±102.84 | 687.62±81.61 | 783.43±148.11 | 754.56±140.71 |

* : Mean±S.D.

**Table 3.** The effect of carbachol on $Mg^{++}$ ATPase activity (m $\mu$moles Pi/mg protein/hr)

| ATP conc. \ Carbachol conc. | Control | $10^{-9}$M | $10^{-7}$M | $10^{-5}$M | $10^{-3}$M |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 mM | 216.18±29.56* | 216.18±24.68 | 222.13±28.52 | 231.39±27.66 | 196.75±22.38 |
| 0.5 mM | 340.55±18.53 | 370.33±11.19 | 351.61±25.10 | 333.80±27.41 | 335.82±18I.2 |
| 1.0 mM | 357.87±33.89 | 399.57±19.36 | 415.83±30.32 | 352.48±25.55 | 365.66±27.57 |
| 1.5 mM | 337.93±53.97 | 500.29±53.84 | 425.77±39.30 | 454.87±59.22 | 430.67±43.77 |

* : Mean±S.D.

**Table 4.** The effect of carbachol on $Na^+$, $K^+$-ATPase activity (m $\mu$moles Pi/mg protein/hr)

| ATP conc. \ Carbachol conc. | Control | $10^{-9}$M | $10^{-7}$M | $10^{-5}$M | $10^{-3}$M |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 mM | 93.27±35.31* | 65.68±6.76 | 106.38±65.33 | 147.36±86.22 | 162.43±64.28 |
| 0.5 mM | 179.76±31.08 | 132.16±30.35 | 156.25±50.96 | 227.14±20.13 | 195.71±47.90 |
| 1.0 mM | 303.13±30.19 | 272.81±18.24 | 253.27±29.62 | 318.97±56.68 | 327.20±48.90 |
| 1.5 mM | 313.06±35.68 | 211.45±29.94 | 261.85±28.82 | 328.56±27.95 | 323.89±66.57 |

* : Mean±S.D.

Carbachol의 농도 $10^{-9}$M-$10^{-3}$M에서 활성도가 증가하는 경향을 나타내었으며 그 효과는 tris-ATP 1.5 mM일때 비교적 뚜렷이 보이고 있음을 알 수 있었다.

tris-ATP 1.5mM일때 carbachol $10^{-9}$M-$10^{-3}$M에서의 total ATPase 증가분은 평균 대조의 12.8%를 보였다. 이러한 total ATPase 활성도 증가는 Table 3에 보이는 것과 같이 $Mg^{+2}$-ATPase 활성도 증가에 기인한 것으로 보인다.

### 3) $Mg^{+2}$-ATPase activity에 미치는 carbachol의 영향

Table 3은 carbachol이 $Mg^{+2}$-ATPase 활성도에 미치는 영향을 나타내고 있다.

Carbachol 농도 $10^{-9}$M-$10^{-3}$M에서 활성도 증가를 나타내었으며 total ATPase와 같은 경향을 보여서 대조 ATPase 활성도의 plateau를 이루는 tris-ATP 농도 1.5 mM에서 그 효과가 비교적 뚜렷이 나타났다.

$Mg^{+2}$-ATPase activity는 carbachol $10^{-9}$M-$10^{-3}$M에서 tris-ATP 1.5 mM을 가했을 때 대조 $Mg^{+2}$-ATPase 활성도보다 평균 30.16%의 증가를 나타내었다.

### 4) $Na^+$, $K^+$-ATPase activity에 미치는 carbachol의 영향

Table 4는 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도에 미치는 carbachol의 효과를 보이고 있다.

Carbachol 농도가 $10^{-9}$M-$10^{-7}$M일때 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도 억제를 나타내고 있으나 그 외의 carbachol 농도에서는 뚜렷한 효과를 보이고 있지 않았다. Carbachol 농도를 $10^{-9}$M-$10^{-3}$M로 변화시켰을 때 농도가 높

아짐에 따라 억제효과가 적어지는 것을 관찰하였으며 tris-ATP 농도 변화에 따른 효과에 있어서 total ATPase, $Mg^{+2}$-ATPase에서와 같은 경향을 보이지 않았으며 tris-ATP의 낮은 농도에서도 비교적 그 효과를 관찰할 수 있었다.

Tris-ATP 1.5 mM 일때 carbachol 농도 $10^{-9}$M-$10^{-7}$M에서 대조 활성도 보다 평균 24.4%의 감소를 나타내었다.

## 고 찰

$Na^+$, $K^+$-ATPase는 동물세포의 세포질 막의 한 성분으로 ATP 분해시 유리되는 에너지를 이용하여 $Na^+$과 $K^+$의 능동수송에 관여하여 정상상태 세포의 ion 분포에 기여하고 있으며 여러 조직에서 각각 다른 안정시 막전압의 유지에 관여하고 있다는 것은 주지의 사실이다.

한편 adrenergic drug은 drug-receptor combination으로 cyclic AMP를 second messenger로 한 일련의 과정을 거쳐 그 효과를 나타낸다는 등 비교적 그 기전이 규명된 바 있다[24].

즉 cyclic AMP는 norepinephrine과 유사한 작용을 하며 phosphodiesterase inhibitor를 이용한 실험에서 norepinephrine뿐만 아니라 cyclic AMP의 작용을 모두 증가시키는 것을 볼 수 있었다[29]. 이러한 사실에 대한 생화학적 증명은 이미 이루어져 있어 adrenergic transmission에 있어서 norepinephrine은 세포막 adenylate cyclase를 활성화하여 cyclic AMP를 생성하고 이것이 second messenger로 작용하여 해당조직 기능에 관여하는 protein kinase를 활성화함으로써 조직세포의 기능을 나타내게 된다는 것이다[30].

반면에 cholinergic transmission에 있어서는 그 기전이 뚜렷이 밝혀지지 않았으며 acetylcholine이 세포막 cholinergic receptor에 작용하여 세포막 투과성의 변화를 일으킬 것이라는 막연한 설명을 하고 있다.

즉, acetylcholine 수용체는 세포막 결합 단백질로 acetylcholine과 결합하여 conformational change를 일으켜 ion 투과도의 변화를 초래한다는 것이다.

실제로 electrophorus electricus 세포막 preparation을 이용한 실험에서 Kasai와 Changeux[31]는 energy source와 농도경사를 배제한 상태에서 closed vesicle이나 microsac으로 reseal하였을 때 choline 효능약에 의하여 $Na^+$투과도가 변하는 것을 관찰하였으며 Karlin고 추측하고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지[32]에 의하면 electrophorus electricus의 electric organ으로부터 얻은 electroplax에서 choline 효능약에 의해 세포내 $K^+$농도는 2배 감소하고 세포내 $Na^+$농도는 10배 증가하였다고 보고하고 있으나 후에 Changeux와 Blumenthal[33]에 의하면 흥분시 innervated membrane에서 ion은 수동적으로 이동하지만 세포의 부피가 크고 능동수송이 충분히 활발하게 일어나므로 세포내 ion의 평형상태 농도는 별로 변하지 않는다고 보고하면서 Higman 등[34]과 Changeux and Podleski[35]의 주장대로 이러한 평형상태 전압이 innervated membrane의 ion 투과도 변화에 의한 것임을 확인하였다.

이러한 흥분성 조직에서의 ion 투과도 변화 외에도 acetylcholine에 의하여 corneal epithelium으로부터 stroma로의 $Na^+$이동이 감소됨이 보고되었으며[36] cat submandibular gland로부터 acetylcholine 투여시 $K^+$의 유출이 일어나며 이때 이에 대응하여 $Na^+$의 유입이 일어난다는 보고가 있다[37].

또한 흰쥐 골격근에서도 acetylcholine과 acetylcholine 수용체의 결합반응에 의하여 세포막 재배열이 일어나고 ion channel을 통하여 전기화학적 농도경사에 따른 $Na^+$과 $K^+$의 이동이 일어난다고 하였다[38].

일반적으로 choline 효능약의 중추신경계에 대한 효과에 관하여서는 muscarinic excitation시 세포막 탈분극과 함께 세포막 $K^+$투과도 감소에 의한 저항 증가 현상을 보이고 있으며 이러한 저항증가와 전도성 감소가 muscarine 수용체에서 acetylcholine의 주된 효과로 생각되고 있다[39,40].

Nicotine 수용체에 acetylcholine과 그 유도체를 투여하면 빠른 흥분을 일으켜서 세포막 탈분극과 함께 $Na^+$과 $K^+$의 투과도 증가에 의한 세포막 저항 감소를 나타내고 있다[41,42].

한편 cholinergic inhibition의 기전으로는 심장에서의 vagal cholinergic inhibition에서와 같이 세포막 $K^+$투과도 증가 또는 인접하고 있는 억제세포의 흥분을 매개로한 간접적인 작용등을 생각해 왔으나 최근에 와서는 acetylcholine이 절전신경에 작용하여 excitatory terminal로부터 transmitter release를 억제하거나 세포막 $Na^+$투과도를 억제한다고 생각되고 있다.

이와같은 cholinergic transmission에서의 ion 투과도 변화라는 기전에 관하여서는 일반적으로 acetylcholine이 acetylcholine macromolecular receptor에 결합하면 conformational transition이 일어나고 acetylcholine과는 다른 diffusable signal 등에 의하여 ionophore로부터 secondary ionic event가 일어날 것이라

않다.

Choline 효능약이 acetylcholine 수용체와 비슷한 성질[44]을 갖고있는 acetylcholinesterase에 의하여 가수분해될 때 세포막 투과성이 변하게 된다는 것이 개구리의 hemoencephalic barrier[45]와 개의 적혈구를 통한 실험에서 보고된 바 있으며 특히 적혈구 세포막에서 이러한 acetylcholine-acetylcholine esterase system이 적혈구 막의 integrity 유지에 중요한 역할을 하므로 acetylcholine 용액내에 적혈구를 부유시켰을때 $Na^+$의 세포내 유입과 $K^+$의 세포 밖으로의 유출이 지연되며 acetylcholinesterase를 기질이 없는 상태에서 불활성화 시켰을때 세포막의 선택적 투과성을 잃는다는 보고는 이미 있어 왔다[46,47]. 이러한 보고에 의하면 acetylcholinesterase와 $Na^+$, $K^+$-ATPase는 세포막의 선택적 ion 투과성에 관여한다는 점에서 매우 유사한 역활을 하고 있다고 할 수 있겠으나 electrophorus electricus electroplax의 homogenate를 이용한 실험에서 choline 효능약은 acetylcholinesterase 로부터 ion flux를 stimulate하는 것이지 ATPase rich fraction을 통한 작용이 아니라고 하였다[48].

Cholinergic transmission에서 이러한 acetylcholinesterase를 통한 ion flux stimulation 외에도 choline 性 흥분시 많은 조직에서 cyclic nucleotide인 guanosine 3′5′-cyclic monophosphate (C-GMP)의 증가현상이 보고된 바 있고[49~51], 최근에도 rabbit ileal mucosa에서 carbachol의 투여로 C-GMP의 일시적 증가가 보고되었으므로[52] C-GMP가 choline 性 muscarine 수용체 작용에서 *second messenger*로 작용한다는 생각이 증가되고 있고 다른 humoral agent들의 가능성도 추측되고 있는 실정이다.

또한 전술한 바와 같은 Kasai와 Changeux 등의 생각에도 불구하고 $Na^+$, $K^+$-ATPase의 cholinergic transmission의 기전에의 관련 가능성은 많이 시사되고 있으며 isolated electroplax를 cholinergic stimulation시 noninnervated membrane에 풍부한 active transport ATPase가 innervated membrane의 탈분극에 필요한 ion 농도경사를 유지한다는 사실로 미루어 보아도 알 수 있으며 Demen과 Vanhoutte[53]는 혈관 평활근에서 acetylcholine이 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도를 증가시키므로 acetylcholine이 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 작용함으로써 혈관 평활근에 대한 직접적인 이완효과를 나타낼 것이라고 추측하고 있다.

그러나 acetylcholine과 그 유도체의 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 작용은 그 실험재료에 따라 여러가지 다른 양상을 보여서 혈관 평활근[53], fundic gastric mucosa[54]등의 $Na^+$, $K^+$-ATPase에서는 그 활성도를 증가시킨다는 보고가 있으나 Gilbert, Wyllie, Davison은 rat cerebral synaptosome의 $Na^+$, $K^+$-ATPase에서는 활성도를 감소시킨다고 보고하고[55]있고 Desaiah와 Ho는 mouse brain $Na^+$, $K^+$-ATPase에서는 뚜렷한 효과가 없다는[56]등의 보고를 하고 있어 acetylcholine의 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 효과에 관하여는 일관적인 설명을 하기 곤란하며 현재까지는 cholinergic transmission에서 ion 투과도 변화에 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 관여하고 있는지의 여부에 대해서는 뚜렷이 밝혀지지 않았다.

또한 $Na^+$, $K^+$-ATPase는 신경말단에서 transmitter 유리에 관여하여 norepinephrine 유리의 feed back mechanism에서 중요한 역활을 하고 있으며, acetylcholine에 의하여 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 억제되는[55] 것은 Langer[57]의 주장대로 presynaptic nicotine, muscarine 수용체 활성화가 norepinephrine 유리에 영향을 미친다고 하는 기전에 관여하는 것으로 추측되고 있다.

본 실험에서는 cholinergic drug에 의한 탈분극과 ion 투과도 변화가 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 어떤 영향을 미쳐서 일어나는 것인가를 관찰하기 위하여 noninnervated membrane인 가토 적혈구 세포막에서 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도에 대한 carbachol의 영향을 관찰하였다.

실험결과 cholinergic muscarinic agonist인 carbachol $10^{-9}$M-$10^{-7}$M에 의하여 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도가 억제되는 경향을 보이고 있음을 알았다.

Total ATPase activity가 carbachol $10^{-9}$M-$10^{-3}$M 농도하에서 증가되는 경향을 보이는 것은 같은 조건하에서 $Mg^{+2}$-ATPase activity가 증가하는 것에 기인한다고 볼 수 있으며 기질이 충분히 존재할 때 그 효과를 잘 관찰할 수 있음을 알았다.

본 실험에서 사용한 carbachol은 acetylcholinesterase의 영향을 받지 않으므로 적혈구 세포막에서 acetylcholinesterase를 통한 ion flux, choline 효능약의 가수분해등을 완전히 배제할 수 있었다고 볼 수 있으며 따라서 choline 효능약의 직접적인 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 효과만을 관찰한 것이라고 할 수 있다.

실험결과에서 $Na^+$, $K^+$-ATPase가 carbachol에 의하여 억제되는 경향을 나타내고 있으므로 cholinergic transmission에서 cholinergic drug에 의한 탈분극과 ion 투과도 변화가 $Na^+$, $K^+$-ATPase 활성도 억제를 통한 것이라고 추측된다.

그러나 cholinergic transmission의 기전이 단지 $Na^+$, $K^+$-ATPase 억제를 통한 것만이라고는 설명하기 어려우며 cholinergic drug의 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 효과가 실험재료에 따라 다른 양상을 보이므로 직접적인 $Na^+$, $K^+$-ATPase에 대한 영향외에도 간접적인 다른 요소를 통한 작용 등을 생각할 수 있다.

본 실험에서는 적혈구 세포막이 비교적 쉽게 분리되고 다른 세포내 구조물의 contamination이 적다는 점, 적혈구 세포막은 noninnervated membrane이라는 점, carbachol이 acetylcholinesterase의 영향을 배제할 수 있다는 점으로 미루어 비교적 직접적인 효과를 볼 수 있었다고 할 수 있으므로 cholinergic transmission에서 $Na^+$, $K^+$-ATPase 억제가 적어도 그 일부를 담당하리라 추측된다.

한편, cholinergic transmission에서 $Ca^{+2}$의 중요성이 근자에 많이 대두되고 있으므로 cholinergic drug과 $Ca^{+2}$-ATPase와의 관련성이 앞으로 더욱 추구되어야 할 것으로 생각된다[58].

## 결 론

1) 가토 적혈구 세포막 total ATPase, $Mg^{++}$-ATPase 및 $Na^+$, $K^+$-ATPase는 모두 tris-ATP 1 mM이상에서 최대활성도를 나타내었다.

2) Total ATPase 활성도는 carbachol $10^{-9}$M-$10^{-3}$M 처리로 약간 증가하는 경향을 보였다.

3) $Mg^{++}$-ATPase도 carbachol $10^{-9}$-$10^{-3}$M 처리로 그 활성도가 증가하는 경향을 보였다.

4) $Na^+$, $K^+$-ATPase는carbachol $10^{-9}$-$10^{-7}$M처리로 활성도 감소현상을 보이고 있으나 그 외의 농도에서는 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다.

따라서 cholinergic transmission mechanism에서 세포막$Na^+$, $K^+$-ATPase 억제는 그 일부를 담당할 것이라 추측된다.

## 참 고 문 헌


1) Arnold Schwartz, George E. Lindenmeyer and Julius C. Allen: *The sodium-potassium Adenosine Triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharm. Rev. 27 (1):3-134, 1975.*

2) Garrahan, P.J. and Glynn, I.M.: *The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol.(London) 192:217-237, 1967.*

3) Sen, A.K. and Post, R.L.: *Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem. 239:345-352, 1964.*

4) Whittam, R. and Ager, M.E.: *The connection between active cation transport and metabolism in erythrocytes. Biochem. J. 97:214-227, 1965.*

5) Skou, J.C.: *The influence of some caticns on an adenosine triphosphatase from peripheralnerves. Biochim. Biophys. Acta. 23:394-401, 1957.*

6) Schatzman, H.J.: *Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium and Natrium Transport durch die Erythocyten Membran. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 11:346-354, 1957.*

7) Dunham, E.T. Glynn, I.M.: *Adenosine tripho sphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. physiol. 156:274-293, 1961.*

8) R.L. Post, C.R. Merritt, C.R. Kinsolving, and Albright C.D.: *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem. 235(6):1796-1802, 1960.*

9) Anner, B.M., Lane, L.K., Schwartz, A., Pitts, B.J.R.: *A reconstituted $Na^+$-$K^+$ pump in liposomes containing purified $Na^+$, $K^+$-ATPase from kidney medulla. Biochim. Biophys. Acta. 467:340-45, 1977.*

10) Goldin, S.M.: *Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla. J. Biol Chem. 252:5630-42, 1977.*

11) Hilden, S., Hokin, L.: *Coupled $Na^+$-$K^+$ transport in vesicles containing a purified $Na^+$, $K^+$-ATPase and only phosphatidylcholine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69:521-27, 1976.*

12) Baker, P.F. : *The ouabain sensitive fluxes. J. Physiol. London. 200:459-96, 1969.*

13) Adrian, R.H., Slayman, C.L.: *Membrane pote-*

*ntial and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle.: J. Physiol. Lond. 184:970-1014, 1966.*

14) Cross, S.B., Keynes, R.D., Rybova, R.: *The coupling of Na influx and K efflux in frog muscle. J. Physiol. London 181:865-80, 1965.*

15) De Weer, P., Geduldig, D.: *Eelctrogenic Na pump in squid giant axon. Science. 179:1326-28, 1973.*

16) Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Pidoplichko, V.I.: *Poteniatl dependent membrane current during the active transport of ions in snail neurons. J. Physiol. London. 226:373-92, 1972.*

17) Thomas, R.C.: *Membrane current and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. J. Physiol. London. 201:495-514, 1969.*

18) Thomas, R.C.: *Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev. 52:563-94, 1972.*

19) Rang, H.P., Ritchie, J.M.: *On the electrogenic Na pump in mammalian non-myelinated nerve fibers and its activation by various external cations. J. Physiol. London. 196:183-221, 1968.*

20) Nakajima, S., Takahashi, K.: *Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na pump in stretch receptor neuron of crayfish. J. Physiol. London. 187:105-27, 1966.*

21) Mullins, L.J., Brinley, F.J.: *Potassium fluxes in dialysed squid axons. J. Gen. Physiol. 53: 704-40, 1969.*

22) Glynn, I.M., Karlish, S.J.D.: *The sodium pump. Ann. Rev. Physiol. 37:13-55, 1975.*

23) Arthur Karlin.: *Molecular interactions of the acetylcholine receptor. Fed. Proc. 32(8):1847-1853, 1973.*

24) Leslie L. Iversen, Susan D. Iversen, Solomon. H. Snyder: *Handbook of psychophamacology. Vol. 6. Biogenic amine receptor, Plenum press, New York and London, 1975.*

25) Bond G.H. and James W. Green: *Effects of monovalent cations on the($Mg^{+2}$+$Ca^{+2}$)-dependent ATPase of the red cell membrane. Biochim. Biophys. Acta. 241:393-398, 1971.*

26) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S.: *Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.*

27) Benjamin N. Horwitt: *Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride J. Biol. Chem. 194:537-541, 1952.*

28) 박찬웅 : *Diphenylhydantoin* 및 *Ouabain*이 흰쥐 적혈구 세포막 *ATPase*에 미치는 영향. 대한약리학잡지. 제6권 제1호, *1970.*

29) Sutherland, E.W., Robinson, G.A., and Butcher, R.: *Some aspects of the biological role of adenosine 3′-5′ monophosphate. Circulation 37: 279-306, 1968.*

30) Leslie L. Iversen, Susan D. Iversen, and solomon H. snyder: *Synaptic. modulators. Handbook of psychopharmacology Vol. 5. Plenum Press, New York and London, 1975.*

31) Kasai, M., Changeux, J.P., J.: *Membrane Biol. 6:1-80, 1971.*

32) Arthur Karlin: *Permeability and internal concentration of ions during depolarization of the electroplax. Biochemistry. 58:1162-1167, 1667.*

33) Robert Blumenthal and Jean-Pierre Changeux: *About the changes of internal ionic concentration in the isolated electroplax during chemical excitation. Biochem. Biophys. Acta. 219:398-404, 1970.*

34) H.B. Higman, T.R. Podleski and E. Bartels: *Biochem. Biophys. Acta, 75:187, 1963.*

35) J.P. Changeux and T.R. Podleski: *Proc. Natl. Sci. U.S. 59:944, 1968.*

36) Ralph W. Stevenson and William S. Wilson: *The effect of Acetylcholine and Eserine on the movement of $Na^+$ across the corneal epithelium. Exp. Eye. Res. 21:235-244, 1975.*

37) Petersen O.H.: *Some factors influencing stimulation-induced release of potassium from the cat submandibular gland to fluid perfused through the gland. J. Physiol. 208:431-447,*

*1970.*

38) Bert Sakmann: *Acetylcholine-induced ionic channels in rat skeletal muscle. Fed. Prod. 37: 2654-2659, 1978.*

39) Woody, C.D., Carpenter, D., Knispel, J.D., Crow, T., and Black-Cleworth, P.: *Prolonged increase in resistance of neurons in cat motor cortex following extracellular iontophoretic application of acetylcholine(Ach) and intracellluar current injection. Fed. Proc. 33:399, 1974.*

40) Krnjevic, K., Pumain, R., and Renaud, L.: *The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex.J. Physiol. 215:247-268, 1971.*

41) Takeuchi, A., and Takeuchi, N.: *On the permeability of end plate membrane during the action of transmitter. J. Physiol. 154:52-67, 1960.*

42) Kobayashi, H., and Libert, B.: *Actions of noradrenaline and acetylcholine on sympathetic ganglion cells. J. Phsiol. 208:353-372, 1970.*

43) Weight, F.F., and Padjen, A.: *Acetylcholine and slow synaptic inhibition in frog sympathetic ganglion cells. Brain Res. 55:225-228, 1973.*

44) Jean-Pierre Changeux, Thomas Podleski, and Jean-Claude Meunier: *On some structural analogies between acetylcholinesterase and the macromolecular receptor of acetylcholine. J. Gen. Physiol. 54:225-243, 1969.*

45) Greig, M.E., and Hollan, W.C.: *Science 110: 237, 1949.*

46) Philip E. Lindvig, Margaret E. Greig andS. W. Peterson:*Studies on permeability. V. The effects of acetylcholine and physostigmine on the permeability of human erythrocytes to sodium and potassium. Arch. Biochem. 30:241-250, 1951.*

47) William C. Holland and Margaret E. Greig: *Studies on the permeability of erythrocytes. III. The effect of physostigmine and acetylcholine on the permeability of dog, cat and rabbit erythrocytes to sodium and potassium. Am. J. Physiol. 162:610-615, 1950.*

48) Kasai, M., and Changeux, J.P.: *Membrane Biol. 6, 1, 1971.*

49) Eichhorn, J.H., E.W. Saltzman, and W. Silen: *Cyclic GMP response in vivo to cholinergic stimulation of gastric mucosa. Nature(Lond.), 248:238-239, 1974.*

50) George, W.J., J.B. Polcer, A.G.C. Tecle, and N.D. Goldberg: *Elevation of guanosine 3'5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 66:398-403, 1970.*

51) Lee, T.P., J.F. Kuo, and P. Greengard: *Role of muscarinic cholinergic receptors in regulation of guanosine 3'5'-cyclic monophosphate content in mammalian brain, heart muscle and intestinal smooth muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:3287-3291, 1972.*

52) Brasitus, T.A., D.V. Kimberg, and M. Field: *Intestinal mucosal cyclic GMP: Possible role in stimulating active ion absorption. Clin. Res. 23:391A, 1975.*

53) J.G., Demey, P.M. Vanhoutte: *Is the direct relaxing effect of acetylcholine on vascular smooth muscle due to activation of $Na^+/K^+$ ATPase? British. J. pharm. 66:150, 1979.*

54) G. Mózsik, L. Magy, J.Kutas & F. Tárnok: *Interaction of cholinergic function with $Mg^{+2}$-$Na^+$-$K^+$-dependent ATP-ase system of cells in the human fundic gastric mucosa. Scand. J. Gastroent. 9:741-745, 1974.*

55) John C. Gilbert, Michael G. Wyllie, Diana V. Davison: *Nerve terminal ATPase as possible trigger for neurotransmitter release. Nature 255(15):237-238, 1975.*

56) D. Desaiah, I.K. Ho: *Kinetics of catecholamine sensitive $Na^+$-$K^+$ ATPase activity in mouse brain synaptosomes. Biochemical Pharmacology, 26:2029-2035, 1977.*

57) Langer, S.Z.: *Biochem. Pharm. 23:1793-1800, 1974.*

58) Joan E. Rothlein, Stanley M. Parsons: *Specificity of association of a $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ ATPase with cholinergic synaptic vesicles from torpedo electric organ. Biochem. Biophys. Res. Comm. 88(3):1069-1076, 1979.*