

Aminoglycosides 의 취효소 분비항진기전에 관한 연구

연세대학교 의과대학 약리학교실

심 호 식 · 김 경 환 · 홍 사 석

=Abstract=

Studies on the Enzyme-releasing Mechanism of Aminoglycosides from Pancreas

Ho Shik Shim, Kyung Hwan Kim and Sa Suk Hong

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Aminoglycoside antibiotics are reported to enhance the amylase release from isolated slices of pancreas in vitro and the mode of action of aminoglycosides on amylase release is considered different from those of acetylcholine or cholecystokinin(CCK), i.e., electronmicroscopically intact zymogen granules are appeared in the lumen of pancreatic acini by treatment of aminoglycosides.

It is known that atropine blocks the secretagogue effect of acetylcholine, and phenoxybenzamine is reported to block the effects of CCK or its analogue caerulein.

Present study was undertaken to investigate the mode of action of aminoglycosides on the amylase release using atropine, phenoxybenzamine and propranolol as a membrane stabilizing agent in slices of chicken pancreas.

The results are summarized as follows:

- 1) Streptomycin and kanamycin increased the amylase release significantly from slices of chicken pancreas.
- 2) The effect of streptomycin was inhibited by atropine but not by phenoxybenzamine or propranolol.
- 3) The amylase release by acetylcholine was blocked by atropine but the effect of cholecystokinin octapeptide(CCK-8) was not influenced by atropine, phenoxybenzamine or propranolol.
- 4) Pretreatment of streptomycin enhanced the secretagogue effect of acetylcholine or CCK-8.

From these results it is suggested that amylase releasing effects of aminoglycosides are mediated in part by cholinergic stimulation and in part by membrane alteration and these effects are enhanced by acetylcholine or cholecystokinin.

서 론

Aminoglycosides 항생제는 세균의 단백질합성을 억압하므로 항균효과를 나타내며 streptomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin, tobramycin 등은 임상적으로 널리 사용되고 있는 제제이다.

* 본연구의 일부는 1983년도 연세대학교 의과대학 약리학교실 유한 연구비의 보조로 이루어졌음.

ycin, gentamicin, amikacin, tobramycin 등은 임상적으로 널리 사용되고 있는 제제이다.

취효소는 생체내에서 단백질합성이 왕성한 장기로서 단백질의 합성 및 분비를 연구하는데 적합한 model로 인정되고 있다. Singh 등(1972, 1973)은 흰쥐 취효소절편 실험에서 streptomycin은 효소유리를 증가시키고 purp-omycin은 조직내 amylase 함량을 감소시키나 amylase

유리에는 별 변동을 주지 못한다고 하였다.

김등(1982)은 닭취장 절편을 이용한 실험에서 streptomycin을 비롯한 7종의 aminoglycoside 항생제가 모두 amylase 유리를 증가시키는 효과를 관찰하였고 또한 고양이 적출관취장표본 실험에서도 streptomycin 및 kanamycin이 amylase 분비를 증가시켰다고 하였다.

취효소 분비를 항진시키는 생리적 자극인자로는 acetylcholine과 cholecystokinin(CCK)이 대표적 물질이며 acetylcholine의 효소 분비작용은 atropine에 의해 선택적으로 봉쇄되나 CCK 반응에 대하여는 아직 선택적으로 봉쇄시키는 물질이 알려져 있지 않다. 다만 조 및 그의 협동연구자는 아드레날린성 α -수용체 봉쇄제인 phenoxybenzamine이 CCK와 구조 및 작용이 비슷한 caerulein의 담낭수축작용(조등, 1976), 취외분비반응(김등, 1976), 식도평활근 수축작용(조등, 1980)을 특이하게 차단한다고 보고한 바 있다.

따라서 본 실험에서는 닭취장절편을 이용하여 aminoglycosides의 취효소 분비 항진효과를 acetylcholine 및 cholecystokinin octapeptide(CCK-8)와 비교하였으며 또한 이들 효과에 대한 atropine 및 phenoxybenzamine의 영향을 검색하고 아울러 세모막 안정효과를 가진 propranolol의 영향을 관찰하여 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

실험동물로는 시판 잡종 닭을 구입하여 암수 구별없이 사용하였으며 머리부분 경수를 잘라 희생시켜 취장을 분리 적출하였다.

적출 취장은 생리적 식염수내에서 지방질, 혈관등을 제거한 다음 100 mg 안팎 크기의 절편을 만들었다.

취절편 표본의 incubation media로는 NaCl 120, KCl 4.5, MgSO₄ 1.0, CaCl₂ 2.5, NaH₂PO₄ 1.0, glucose 5.0, NaHCO₃ 25 mEq/l를 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(KRBB)를 95% O₂와 5% CO₂로 포화시켜 pH를 7.4로 유지시켜 사용하였다. 각 취절편은 2 ml의 KRBB 용액이 들어있는 마개달린 vial에 옮겨 37°C로 유지한 shaking water bath에서 incubate 하였으며 실험에 사용하기전 취절편은 2회에 걸쳐 20분간씩 예비 incubation을 실시하여 KRBB 용액과의 평형을 이루게 하였고 이 기간동안 amylase의 유리는 무시하였다. 이 기간이 끝난 다음 10분간씩 취절편을 incubation 하면서 amylase 유리를 관찰하였으며 첫 vial은 amylase의 기초 유출치를 측정하고 그 다

음 vials에는 KRBB 용액에 차례로 전처치 약물과 분비자극제를 첨가하여 amylase 유리변동을 관찰하였다.

취장절편 표본의 이등은 polyethylene hook을 사용하여 조직손상을 피하였으며 incubation이 끝난 다음에는 절편의 무게를 측정하였다(Case 및 Clausen, 1973, 조등 1981, 김등 1982).

Amylase 활성은 Bernfeld 법(1955)으로 측정하여 IU/10 min/g으로 표시하였다.

사용한 약물은 streptomycin sulfate(한독약품), kanamycin sulfate(동아제약), acetylcholine chloride(Sigma Chemical Co.), cholecystokinin octapeptide(CCK-8, ER Squibb Co.), 및 atropine sulfate(City Chemical Co.), phenoxybenzamine(Smith Kline & French Co.), propranolol(Sigma Chemical Co.)이었다.

실험성적

1) Streptomycin 및 kanamycin의 취장절편 amylase 유리에 대한 영향

Streptomycin 20 mg을 취절편이 든 KRBB 2 ml에 첨가하므로 amylase 유리는 유의있게 증가하였으며($p < 0.001$) 용량을 50 mg으로 증가하여도 더 이상의 유리항진은 없이 효소치는 비슷하였다. Kanamycin 역시 20 mg 또는 50 mg 투여로 취절편의 amylase 유리는 유의있게 증가되었다(제 1 표)($p < 0.001$).

한편 대조실험으로 acetylcholine을 $10^{-6}M$ 이 되게 KRBB에 첨가하므로 취장절편의 amylase 유리는 현저히 증가하였고 CCK-8 $10^{-7}M$ 을 투여한 효과도 이와 비슷하게 현저하였다(제 1 표).

2) Streptomycin의 amylase 유리효과에 대한 atropine, phenoxybenzamine 및 propranolol의 영향

닭취장 절편에 atropine $10^{-6}M$ 을 전처치하므로 streptomycin 50 mg에 의한 amylase 유리 항진효과는 봉쇄되었다.

그러나 phenoxybenzamine 또는 propranolol 전처치로는 streptomycin의 amylase 유리 항진효과는 변함이없었고 각 봉쇄제 단독처치에 의해서도 amylase 변동은 볼 수 없었다(제 2 표).

한편 acetylcholine에 의한 amylase 유리반응은 atropine 전처치로 완전히 봉쇄되고 phenoxybenzamine 또는 propranolol 전처치로는 아무런 영향을 받지 않았

제 1 표. Effect of aminoglycosides and secretagogue on amylase release from slices of c hicken pancreas

Treatment	Dose	N	Amylase(IU/10 min/g)	
			Control	Treated
Streptomycin	20 mg/2 ml	11	3.29±0.60	5.03±0.83***
	50 mg/2 ml	15	4.33±0.53	6.43±0.55***
Kanamycin	20 mg/2 ml	5	2.76±0.10	4.89±0.26***
	50 mg/2 ml	4	4.00±0.97	5.01±0.61**
Acetylcholine	10 ⁻⁶ M	11	4.22±0.60	5.90±0.55***
CCK-8	10 ⁻⁷ M	10	4.83±0.51	8.24±0.48***

Values are means±S.E.
p<0.01, *p<0.001 (Difference from control by paired t-test)

제 2 표. Effect of blocking agents on the amylase releasing activities of streptomycin and secretagogues from slices of chicken pancreas

Secretagogue	Dose	N	Pretreatment	Control	Pretreatment alone	Pretreatment with Secretagogue
Streptomycin	50 mg/2 ml	6	Atropine 10 ⁻⁶ M	2.65±0.28	2.65±0.27	2.82±0.31
		6	PBZ 10 ⁻⁴ M	5.38±0.46	5.77±0.78	7.79±0.43*
		6	Propranolol 10 ⁻⁶ M	5.46±0.85	5.18±0.56	8.52±0.68**
Acetylcholine	10 ⁻⁶ M	6	Atropine 10 ⁻⁶ M	3.19±0.51	3.33±0.58	2.50±0.34
		6	PBZ 10 ⁻⁴ M	5.13±0.57	5.73±0.49	6.81±0.58*
		6	Propranolol 10 ⁻⁶ M	4.61±0.62	4.16±0.40	6.56±0.54*
CCK-8	10 ⁻⁷ M	6	Atropine 10 ⁻⁶ M	6.15±0.61	5.11±0.26	10.41±0.83**
		6	PBZ 10 ⁻⁴ M	7.24±0.86	5.64±0.76	10.79±1.70***
		6	Propranolol 10 ⁻⁶ M	5.43±0.65	5.05±0.86	9.27±0.94***

Values are means±S.E.
*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 (Difference from pretreatment alone by paired t-test)
PBZ: Phenoxybenzamine

제 3 표. Effect of streptomycin on the amylase releasing action of CCK-8 and acetylcholine from slices of chicken pancreas

Treatment	N	Control	Amylase(IU/10 min/g)	
			Pretreated with Streptomycin	Treated
CCK-8	6	3.20±0.34	5.15±0.32***	7.46±1.08†
Acetylcholine	6	3.78±0.83	5.89±1.22*	10.36±2.00††

Values are means±S.E.
**p<0.01 (Difference from control by paired t-test)
†p<0.05 ††p<0.01 (Difference from streptomycin pretreatment by paired t-test)

다. CCK-8 효과는 특이하여 phenoxybenzamine 및 propranolol 에는 물론 atropine 에 의해서도 봉쇄되지 않았다(제 2 표).

3) Streptomycin 과 CCK-8 또는 acetylcholine 병용의 영향

Streptomycin 은 취절편 표본에서 amylase 유리증

가 작용을 나타내고 이에 CCK-8 $10^{-7}M$ 을 병용하므로 그 유리작용은 더욱 항진되었다.

Acetylcholine 역시 streptomycin 에 의한 amylase 유리반응을 더욱 항진시킴을 볼 수 있었다(제 3 표).

고 찰

취효소는 단백질합성이 작별히 왕성한 조직이므로 단백질합성 실험에 많이 이용되고 있다.

Streptomycin 을 비롯한 aminoglycoside 항생제는 공통적으로 세균의 30s ribosome 소단위에 작용하여 aminoacyl tRNA 와 mRNA 의 기호(codon)를 정확히 대응시키지 못하게 하고 따라서 peptide chain 의 아미노산 순서에 차질을 초래케 하므로 세균의 단백질합성을 억압한다. 이와같이 aminoglycoside 항생제는 세균에 독성을 발휘할 뿐만 아니라 포유동물에서도 세균에서와 비슷한 ribosome 을 함유하는 mitochondria 에 유독하여 사람에서는 이(耳) 독성 및 신(腎)독성이 심하고 또한 신경근 봉쇄작용도 나타낸다. Aminoglycoside 에 의한 신경근 봉쇄작용은 신경말단에서 calcium 이온과 결합하여 acetylcholine 유리를 억압하므로 나타난다고 한다(Sande 및 Mandell 1980).

Aminoglycoside 항생제에 의한 위장관 기능변동에 관한 보고는 많지 않으며 김(1973)은 streptomycin 투여로 위산분비 억제와 위궤양 발생억제를 관찰하였고 심등(1983)은 acetylcholine 이나 histamine 에 의한 위장관운동이 streptomycin 전처치로 저하된다고 보고하였다.

Singh 등(1972, 1973)은 흰쥐 취장절편에서 amylase 유리가 streptomycin 이나 lidocaine 투여로 증가되고 또한 tetracaine, valinomycin, amphotericin B 등으로 증가되었으며 puromycin 이나 dactinomycin 은 조직내 amylase 함량만 감소시켰다고 보고하였다.

김등(1982)은 streptomycin 을 비롯한 7종의 aminoglycoside 항생제를 탐취장 절편에 투여하므로 정도의 차이는 있으나 모두 amylase 유리를 항진시킨다고 하며 전기영동상 단백질분획의 증가도 관찰하였다. 또한 aminoglycoside 투여후의 특이한 소견으로 CCK 나 acetylcholine 투여때와는 달리 전자현미경상 zymogen 과립이 선포강(lumen)내에 원형 그대로 유출되어 있음을 관찰하고 이는 streptomycin 의 세포막에 대한 작용에 기인된다고 설명하였다.

취효소 분비는 생리적으로 소장점막에서 유리되는 cholecystokinin 과 미주신경 흥분에 의한 acetylcho-

line 으로 유발되며 이들의 작용에는 모두 calcium 이온이 second messenger 로서 작용한다(Case, 1978). Acetylcholine 의 취효소 분비작용은 atropine 으로 봉쇄되나 CCK 의 분비작용을 선택적으로 봉쇄하는 물질은 아직 없다.

CCK 는 33개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 홀몬이지만 이 작용은 C-말단 8개 펩타이드(CCK octapeptide, CCK-8)만으로 충분하며(Ondetti 등, 1970) 또한 개구리 피부에서 추출한 caerulein 은 CCK-8과 비슷한 아미노산 배열 및 작용을 나타낸다(Ersparmer 등 1967, Anastasi 등 1968).

조 및 그의 협동연구자들은 phenoxybenzamine 전처치로 caerulein 에 의한 담낭수축반응(1976), 취효소 분비반응(1976) 및 식도절편 수축반응(1980)이 특이하게 억제됨을 관찰하고 이 작용은 아드레날린성 α 수용체 봉쇄작용과는 무관한 것이라고 하였다.

본 실험에서 streptomycin 및 kanamycin 모두 탐취장절편의 amylase 유리를 항진시켰으며 이 작용은 atropine 에 의해서는 봉쇄되나 phenoxybenzamine 또는 propranolol 에 의해서는 봉쇄되지 않았다. 이러한 결과는 streptomycin 의 효과가 물린성 수용체를 경유하여 나타난다고 생각할 수 있으나 김등(1982)의 전자현미경상 소견에서 zymogen 과립의 선포강내 유출현상과를 이 소견과 대조하여 생각할 때 그 작용기전이 acetylcholine 과 같다고 보기는 곤란하다.

한편 CCK-8의 효소유리 항진작용은 atropine, propranolol 또는 phenoxybenzamine 의 영향을 받지 아니하였으나 acetylcholine 의 효소유리 효과는 atropine 에 의해서 완전 봉쇄됨을 볼 수 있었다. 이같은 결과는 acetylcholine 과 CCK 의 작용부위(수용체)가 서로 다르다는 것을 말해 준다. 또한 aminoglycoside 의 작용은 김등(1982)이 보고한 바와같이 생리적 취효소 분비 항진제의 작용과는 다르다고 생각된다. 한편 조등(1976, 1980)이 생체내에서 관찰한 phenoxybenzamine 의 caerulein 작용 봉쇄작용에 대하여서는 앞으로 추후할 과제라고 생각한다.

취선포에서 아미노산이 흡착되어 zymogen 과립에 농축되기에는 약 120분이 걸리며(Jamieson 및 Palade, 1967) 따라서 단백질합성이 변동되더라도 그 효과는 즉각 나타나지 않는다. 이에 비하여 CCK 나 acetylcholine 같은 효소분비 촉진제는 수초 또는 수분 이내에 세포막 탈분극 및 효소유리등의 작용을 나타내나, 단백질합성 항진효과는 서서히 일어나 40분에 최고로 달한다고 한다. 그러므로 단백질합성 촉진이나 억제자 곧 효

소유리 변동에 영향을 주지 못한다(Gardner 1979).

Otsuki 및 Williams(1982)는 취선포세포에 단백질 합성 억제제인 puromycin 이나 cyclohexidine 을 2시간 preincubation 함으로 CCK-8이나 carbamylcholine 의 효소유리 항진작용이 증강되었다고 하며 이는 단백질 합성 억제제가 calcium 이온 이동을 억제하는 단백질 합성을 저해하므로 나타난 결과라고 하였다.

본 실험에서 streptomycin 을 10분내지 30분동안 전 처치하므로 CCK-8이나 acetylcholine 의 분비 항진효과를 상승시킬 수 있었다. 그러나 streptomycin 등 aminoglycoside 항생제는 30 s ribosome 소단위에 작용하므로 포유동물의 세포단백합성에는 영향이 적고, 또한 streptomycin 과 CCK-8 혹은 acetylcholine 을 병용할 때 상승작용이 단시간에 나타남을 보아 이의 작용이 puromycin 과 같다고 볼 수는 없다. 또한 calcium 이온은 효소분비에 중요하나 aminoglycoside 는 신경근 접합부에서 오히려 calcium 과 길항하며 신경근 봉쇄작용을 나타내므로 streptomycin 의 효과와 calcium 이온과를 관련짓기도 곤란하다.

본 실험결과를 종합하여 볼 때 aminoglycoside 항생제는 담취장전편의 효소유리를 증가시키며 그 작용기전의 일부는 콜린성 수용체를 경유하여 나타나고 그의 선세포에 대한 직접작용도 관련된다고 생각한다.

결 론

Aminoglycoside 에 의한 취외분비 항진효과의 기전을 탐 취장전편표본에서 추궁하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) Streptomycin 및 kanamycin 은 담 취장전편에서 amylase 유리를 현저히 증가시켰다.
- 2) Streptomycin 에 의한 amylase 유리항진 효과는 atropine 으로 봉쇄 억압되나 phenoxybenzamine 또는 propranolol 전처치로는 별 영향이 없었다.
- 3) Acetylcholine 의 amylase 유리항진효과는 atropine 으로 완전 봉쇄되나 CCK-8효과는 atropine, phenoxybenzamine 또는 propranolol 에 의해 봉쇄되지 않았다.
- 4) Streptomycin 의 amylase 유리항진효과는 acetylcholine 또는 CCK-8의 병용으로 상승되었다.

이상의 성격으로 보아 aminoglycoside 항생제는 담취장전편의 효소유리를 증가시키고 또한 acetylcholine 이나 CCK 의 효과를 상승시키며 이와 같은 aminoglycoside 작용의 일부는 콜린성 수용체를 경유하여 나

타나고 그의 세포막에 대한 직접 효과도 관련된다고 생각된다.

참 고 문 헌

Anastasi, A., Erspamer, V. and Endean, R.: *Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of skin of Hyla caerulea.* Arch. Biochem. Biophys., 125:57-68, 1968.

Bernfeld, P.: *Amylase α and β .* In *Methods in enzymology, Vol 1*(Clowick SP and Kaplan No, eds) Academic press, pp. 149-150, 1955.

Case, R.M.: *Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells.* Biol. Rev., 53: 211-354, 1978.

Case, R.R. and Clausen, T.: *The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas.* J. Physiol., 235: 75-102, 1973.

조행작, 김경환, 홍사석 : 티액선 외분비기능의 약리학적 검색. 연세의대논문집, 14:459-473, 1981.

조태순, 김원준, 홍사석 : *Caerulein* 의 담낭수축작용에 관한 연구. 대한약리학회지, 12:83, 1976.

조태순, 김원준, 홍사석 : *Cholecystokinin-pancreozymin* 의 식도전편 수축반응에 미치는 *phenoxybenzamine* 의 영향. 대한약리학회지, 16:35-39, 1980.

Erspamer, V., Bertaccini, G., Endean, R. and Impicciatore, R.: *Pharmacological actions of caerulein.* Experientia., 23:702-703, 1967.

Jamieson, J.D. and Palade, G.E.: *Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell.* J. Cell Biol., 34:577-596, 1967.

김혜영, 노재열, 조태순, 홍사석 : *Caerulein* 의 흰쥐 취외분비반응에 미치는 *phenoxybenzamine* 의 영향. 대한약리학회지, 12:89-93, 1976.

김성규, 최홍재, 김경환, 홍사석 : 취효소분비에 미치는 *aminoglycosides* 의 영향. 대한내과학회지, 25:493-503, 1982.

김원섭 : 이독성 항생물질이 위액분비 및 실험적 위궤양에 미치는 영향. 연세의대논문집, 6:227-238, 1973.

Ondetti, M.A., Rubin, B., Engel, S.L., Pluscec, J.

- and Sheehan, J.T.: *Cholecystokinin-pancreozymin: recent developments. Am. J. Digest. Dis., 15:149-156, 1970.*
- Otsuki, M. and Williams, J.A.: *Protein synthesis inhibitors enhance secretagogue sensitivity of in vitro rat pancreatic acini. Am. J. Physiol., 243:G285-G290, 1982.*
- Sande, M.A. and Mandell, G.L.: *The aminoglycosides: In the pharmacological basis of therapeutics, 6th ed. (Gilman AG, Goodman L and Gilman A eds) Macmillan Publishing Co pp. 1162-1180, 1980.*
- 심민철, 박원규, 홍사석 : 항생제가 장운동에 미치는 영향. 연세의대논문집, "인쇄중"
- Singh, M., Black, O. and Webster, P.D.: *Effect of drugs on pancreatic amylase secretion in vitro. Gastroenterol., 63:449-457, 1972.*
- Singh, M., Black, O. and Webster, P.D.: *Effects of selected drugs on pancreatic macromolecular transport. Gastroenterol. 64:983-991, 1973.*
-