

# Benzyl Alcohol이 세포막의 형태 및 Calcium 이온 이동에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

이 황 현 · 하 종 식 · 김 구 자

(1987년 11월 15일 접수)

— Abstract —

## Effects of Benzyl Alcohol on Structures and Calcium Transport Function of Biological Cell Membranes

Hwang Hyun Lee, Jong Sik Hah and Kuja Kim

*Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University*

Benzyl alcohol is known to have dual effect on the red blood cell shape change. At low concentration up to 50 mM benzyl alcohol transformed the shape from discocyte to stomatocyte by preferent binding to the inner hemileaflet, however, at higher concentration transformed the shape from discocyte to stomatocyte by preferential binding to the inner monolayer, however, at higher concentration above 50 mM benzyl alcohol transformed to echinocyte by affecting both monolayers. These results suggest that the effect of benzyl alcohol on the red blood cell shape and  $Ca^{++}$  transport across cardiac cell membranes to assess the effects of the drug on the structures and functions of the biological cell membranes.

The results are as follows:

- 1) Benzyl alcohol up to 40 mM caused progressive stomatocytic shap change of the red blood cell but above 50 mM benzyl alcohol caused echinocytic shape change.
- 2) Benzyl alcohol up to 40 mM inhibited both osmotic hemolysis and osmotic volume change of the red blood cell in hypotonic and hypertonic NaCl solutions, respectively.
- 3) Benzyl alcohol inhibited both Bowditch Staircase and Wood-worth Staircase phenomena at rat left auricle.
- 4) Benzyl alcohol at concentration of 5 mM increased  $Ca^{++}$ -ATPase activity of red blood cell ghosts slightly but above 5 mM benzyl alcohol inhibited the  $Ca^{++}$ -ATPase activity.
- 5) Benzyl alcohol at concentrations of 5 mM and 10 mM increased  $Ca^{++}$ -ATPase activity slightly at rat gastrocnemius muscle S.R. but above 10 mM benzyl alcohol inhibited the  $Ca^{++}$ -ATPase activity.

Above results indicate that benzyl alcohol inhibit water permeability and  $Ca^{++}$  transport across cell membranes in part via effects on the fluidity and transition temperatures of the bulk lipid by preferential intercalation into cytoplasmic monolayer and in part via other effect on the conformational change of active sites of the  $Ca^{++}$ -ATPase molecule extended in cytoplasmic face.

**Key Words:** Benzyl alcohol,  $Ca^{++}$ -ATPase,  $Ca^{++}$  transport, RBC, SR, Echinocyte, Stomatocyte

서 론

적혈구막은 전형적인 세포막의 구조, 즉 지질의 이

중층(lipid bilayer)으로 되어 있으며, 적혈구내의 ATP 고갈,  $Ca^{++}$  농도의 변화 및 pH의 변화가 있으면 적혈구는 세포막의 변화를 일으켜 거치상

(echinocytic)이나 컵모양(stomatocytic)으로 그 형태를 변화시킬 뿐 아니라(Bessis, 1973; Glader & Sullivan, 1979) in vitro에서 수종의 약물에 의하여서도 형태적 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. (Deuticke, 1968; Mohandas & Feo, 1975; Matayoshi, 1980). Sheetz & Singer(1975)의 "bilayer couple hypothesis"에 의하면 anionic amphipathic molecules은 지질막의 바깥층에 결합하여 이를 선택적으로 확장시키고, cationic amphipathic molecules은 지질막의 안층에 결합하여 이를 선택적으로 확장시킨다고 하였다.

Chabanel et al.(1985)에 의하면 국소마취제로 알려져 있는 benzyl alcohol은 적혈구막에 작용할 때 낮은 농도(<50 mm)에서는 stomatocytogenic 효과를 나타내고, 높은 농도(> 50 mm)에서는 echinocytogenic 효과를 나타내는데, 이는 benzyl alcohol이 낮은 농도에서는 주로 지질막의 안쪽 monolayer에 결합하고 높은 농도에서는 바깥 monolayer에 결합하기 때문이라고 설명하였다. 한편, benzyl alcohol은 세포막에 대해서 perturbing agent로 작용하여 세포막의 fluidity에 영향을 미치는 것으로도 알려져 있다. (Brasitus & Schachter, 1980; Gordon et al., 1980; Houslay & Gordon, 1983; Martin et al., 1985). 이상의 실험보고들은 Miller(1977)가 마취제의 마취기전을 세포막의 팽창에 기인한다고 주장한 "Critical volume hypothesis"와도 일맥상통하는 점이 있다고 보여진다. 따라서, 본 실험은 benzyl alcohol이 세포막에 결합하여 형태를 변화시킬 때에 세포막의 기능에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 세포막에서 이온투과도에 영향을 주어 마취작용을 일으키는 것으로 알려진  $Ca^{++}$  (Campbell, 1983)의 이동에 미치는 영향을 관찰하고 그 기전을 규명하고자 실시되었다.

## 실 험 방 법

### 1. 적혈구의 형태관찰

적혈구의 모양을 관찰하기 위하여 광학현미경을 사용하였다. 관찰하기전 먼저 적혈구 부유액을 준비하고 benzyl alcohol을 0, 20, 40, 80 및 100 mM을 가한 후 10분간 실온에 방치하였다가 이 적혈구를 다

시 0.1% EDTA와 0.25% 혈청알부민이 함유된 Tris-saline buffer (pH 7.4)에 재부유시킨 후 광학현미경 시야에서 젖은 표본상태로 관찰하고 모양의 변화를 사진 촬영하여 비교 하였다. 또한 전형적인 echinocytes와 stomatocytes를 전자현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### 2. 적혈구의 삼투성 용혈(osmotic hemolysis) 및 삼투성 용적변화(osmotic volumechange) 실험

삼투성용혈실험을 위해서는 신선한 사람의 혈액을 채취하여 "적혈구막의 분리"난에서 설명한 바와 같이 적혈구 부유액을 만들고, 미리 준비한  $M/8$ ,  $M/10$ ,  $M/12$ ,  $M/13$ ,  $M/14$ ,  $M/15$ ,  $M/16$ ,  $M/18$ , 및  $M/20$  NaCl 각 용액 4 ml에 적혈구 부유액을 4방울씩 떨어뜨린 후 잘 흔들어 5분간 세워 두었다가  $1,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거하였으며 분광계(Spectronic 2000)를 이용하여 파장 560 nm에서 각 용액의 optical density (O · D)를 측정하고 표준곡선상에서 NaCl 각 농도에서의 용혈정도(% hemolysis)를 구하였다. 용혈정도는 혈구막 밖으로 빠져나온 헤모그로빈의 양에 의해서 결정되고 이는 헤모그로빈이 나타내는 색깔의 농도를 측정하면 알 수 있으므로, 표준곡선을 그리고 위해서 Color standard 용액을 만들때 증류수(1 ml)에 적혈구 부유액(1방울)을 가하여 완전용혈이 일어났을 때의 색깔을 100% Color standard로 하고 이 색깔의 농도를 증류수로 희석하여 75%, 50%, 25% 및 12.5%의 Color standard를 만들고 표준곡선을 그렸다.

삼투적용적변화 실험은 미리 준비한  $M$ ,  $M/2$ ,  $M/3$ ,  $M/4$ ,  $M/5$ ,  $M/6$ , 및  $M/7$ , NaCl 각 용액 1 ml에 적혈구 부유액 1 ml를 가하여 부드럽게 잘 섞은후 hematocrit (Hct) 측정용 원심분리기를 이용하여 각 NaCl 농도에서의 Hct 변화를 측정하였다.

### 3. Bowditch 및 Woodworth Staircase 현상의 묘기

Benzyl alcohol이 Bowditch 및 Woodworth staircase 현상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐(체중 250 g 내외)를 암수 구별없이 경추이골(cervical dislocation)로 희생시키고 심장을 적출한

후 좌심방을 절취하여 장력측정장치(Hah et al., 1978)에 고정하였다. Incubation bath내의 용액은 K-H Ringer (pH 7.4)로 하였고 혼합기체 (95% 산소와 5% 탄산가스)를 공급하여 pH의 변화없이 산소를 공급할 수 있도록 시도하였다. Incubation bath내의 온도는 주위에 부착된 water jacket로 항온조의 물을 순환시키면서 항상 일정하게 37°C를 유지하도록 장치하였다. 근육의 수축을 유도하기 위하여 조직절편 주위에 고정된 백금판과 연결시킨 전기자극기(Nacro Model SI-10)로 자극을 가하면서 심방근의 등장성 수축변화를 force transducer(Narco Myograph F-60)에 연결하여 Physiograph(Naro Model MK-IV)에 기록하였다. 자극의 강도는 조직에 해가 없이 최고장력을 나타낼 수 있는 30 Volts ~ 70 Volts로 하였다. 자극횟수는 0.2 pulses/sec로 전기자극을 하다가 2 pulses/sec로 빨리 자극하면서 수축고가 증가하여 일정하게 되면 다시 0.2 pulses/sec로 환원시켜 주면서 수축고의 변화를 기록하였다. 이때 benzyl alcohol의 농도를 1.43, 2.86 및 4.2 mM 가 하면서 Bowditch Staircase 및 Woodworth Staircase 수축고의 크기의 변화를 기록하고 대조군과 비교하였다.

#### 4. 자극간격의 변화에 따른 장력의 변화 (interval-tension relation ship) 측정

각종 약물의 Bowditch Staircase 및 Woodworth Staircase 현상에 미치는 영향을 연구하는 방법으로 Hajdu(1969)가 시도한 대로 자극간격의 변화에 따른 장력의 변화를 관찰하고 benzyl alcohol이 이에 미치는 영향을 비교 관찰하였다. 즉 위에 기록된 방법대로 장치한 심근에 자극간격을 180, 120, 60, 30, 10, 5, 2 및 1초로 변화시켜 이때의 장력변화를 측정하고 농도를 달리한 benzyl alcohol을 가하고 5분 후에 Bowditch Staircase 및 Woodworth Staircase의 수축고의 변화를 대조군과 비교하였다.

#### 5. 적혈구막의 분리

수혈기간은 지났으나 적혈구막이 inact한 혈액을 혈액은행으로부터 입수하여, Dodge et al.(1963)의 방법으로 전혈(whole blood)을 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 제거하고 ISO

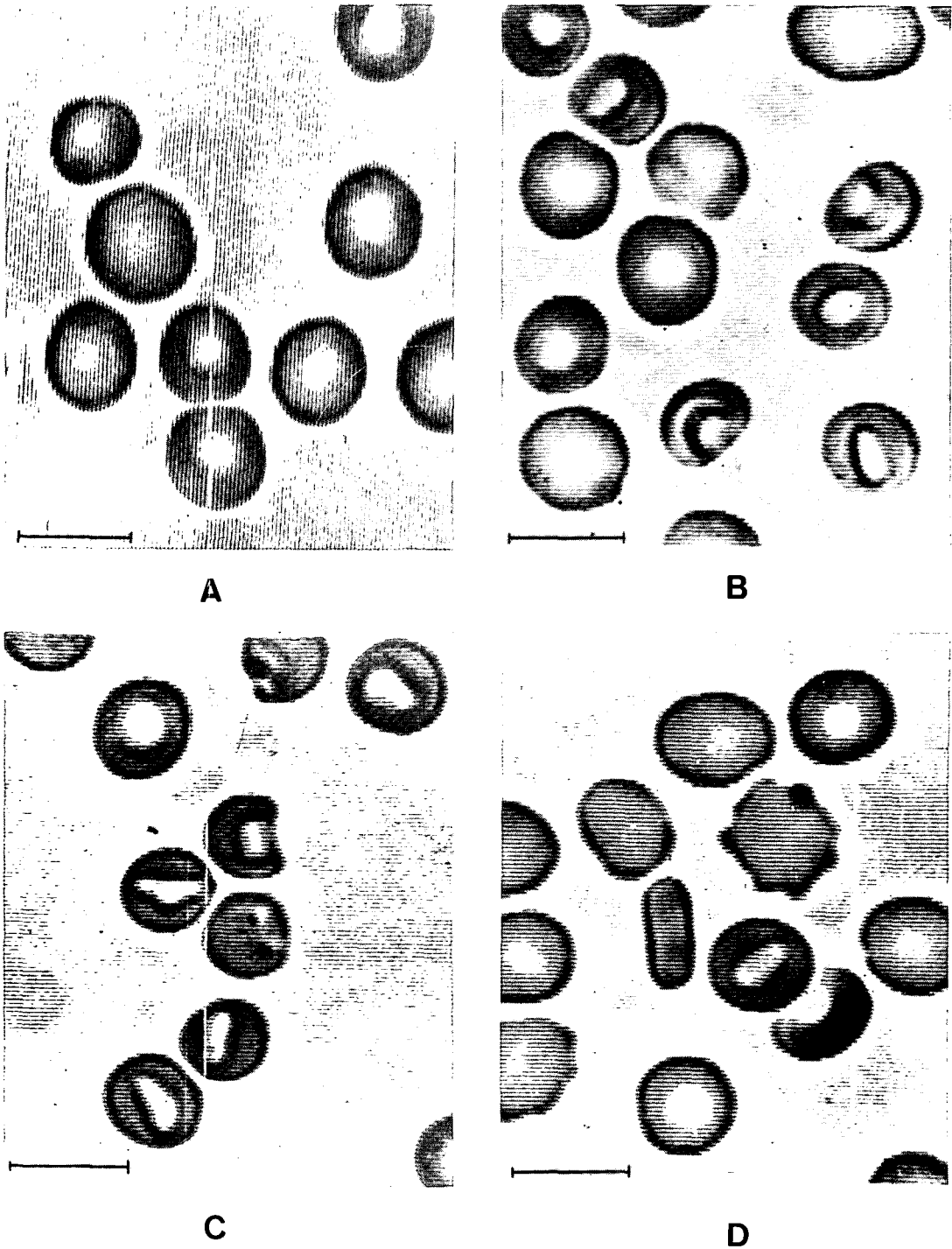
NaCl(155 mM NaCl+10 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 세번 씻은 후 마지막 적혈구 부유액에 백혈구 등이 오염되어 있지 않음을 현미경적 관찰로 확인하였다. 이를 ISO-NaCl로 50% 적혈구 부유액으로 만들었으며, 5 mM의 포도당을 첨가하였다. 적혈구 막을 분리하기 위하여 50% 적혈구 부유액을 일정량 취한 후 약 10배의 1/15 Dodge 용액을 가하여 유리병으로 잘 저은후 냉장고에 20분간 방치하여 용혈시키고 이 용액을 4°C에서 12,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 같은 방법으로 1/15 Dodge 용액으로 용혈시키고 매번 원심력을 17,000×g, 20,000×g 및 27,000×g 차례로 증가시키면서 원심분리하여 적혈구막을 침전물로 얻었다. 대개는 1/15 Dodge 용액으로 네번 용혈시킨 후에는 헤모그로빈이 포함되어 있지 않은 적혈구 막을 얻을 수 있으며, 만약 세번째 20,000×g에서 원심분리한 후 아직도 용혈되지 않은 적혈구가 침전물에 남아 있으면 aspiration으로 제거하였다. 이렇게 해서 얻은 적혈구 막의 부유액은 단백질량이 약 4 mg/ml가 되는데 즉시 실험에 사용하지 않을 경우에는 -70°C에 냉동 보관하였다.

#### 6. 골격근에서의 sarcoplasmic reticulum 분리

흰쥐를 경추이골로 희생시킨 후 Peter & Worsfold (1969)의 방법으로 비장근(gastrocnemius muscle)을 절제하여 조직 g당 10 ml의 냉각된 0.32 M sucrose를 가하고 Waring blender로 1분간 homogenize한 후 두겹의 gauze로 여과하였다. 이 여과액을 4°C에서 8,000×g로 15분간 원심분리하여 mitochondria 등을 제거하고 그 상층액을 60,000×g로 1시간 원심분리하여 sarcoplasmic reticulum (SR)을 얻었다. 가급적 분리한 직후에 실험에 사용하였고 즉시 사용하지 않을 경우에는 -70°C에 냉동 보관하였다.

#### 7. Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도 측정

Cha et al.(1971)의 방법에 의해서 적혈구막 소편 및 S.R.에서의 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도를 측정하였다. 적혈구막 소편에서는 120 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris (pH 7.5)와 CaCl<sub>2</sub>가 0.1 mM 들어 있는 incubation 용액내에 적혈구막 소편의 부유액을 단백



**Plate 1.** Light microscopic pictures of erythrocytes treated with benzyl alcohol at concentrations of 20 mM (B), 40 mM (C) and 80 mM (D), and without benzyl alcohol (A). Magnification 1600x (bar 10  $\mu$ m).

질 농도가 0.3~0.5 mg/ml 되게 넣고 37°C에서 30분간 incubation 하였으며 SR의 경우에는 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10<sup>-6</sup>M CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>++</sup>-EGTA buffer, pH 7.0)인 incubation 용액에 단백질 농도가 0.2 mg/ml되게 sarcoplasmic reticulum 부유액을 가하고 25°C에서 15분간 incubation하였다. 이와같이 Ca<sup>++</sup> 존재시 incubation 용액내 단위 시간 동안에 유리된 무기인산을 총 ATPase 활성도 [또는 (Ca<sup>++</sup> + Mg<sup>++</sup>)-ATPase]로 하고 incubation 용액내에 5 mM의 EGTA를 가하여 Ca<sup>++</sup>을 제거한 후 유리된 무기인산을 Mg<sup>++</sup>-ATPase로 하여 총 ATPase 활성도에서 Mg<sup>++</sup>-ATPase 활성도를 빼준 값을 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도로 하였다. 이때 incubation 용액내에 0, 10, 20, 30, 40, 50 60 및 100 mM의 benzyl alcohol을 첨가하고 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도의 변화를 관찰하였다.

### 8. 단백질 정량

적혈구막 및 SR의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법으로 측정하였고 표준단백질은 소혈청알부민 (bovine serum albumin, B.S.A)을 사용하였다.

## 실 험 성 적

### 1. Benzyl alcohol이 세포막의 형태에 미치는 영향

**1) Benzyl alcohol이 적혈구 형태에 미치는 영향 :** Benzyl alcohol을 적혈구 부유액 속에 20 mM, 40 mM, 80 mM이 되도록 첨가한 후 적혈구 모양의 변화를 관찰한 결과는 그림 1에 나타나 있다. Benzyl alcohol은 적혈구의 모양을 disc형에서 stomatocytic 형으로 변화시켰으며 80 mM 농도에서는 echinocytic 형의 적혈구가 다수 인견되었다.

**2) Benzyl alcohol이 적혈구의 삼투성 용혈현상 (osmotic hemolysis)에 미치는 영향 :** Benzyl alcohol이 적혈구의 삼투성 용혈현상에 미치는 영향은 그림 2에 나타나 있다. Benzyl alcohol은 통계학적으로 유의성은 없었으나 10 mM 및 40 mM에서 다같이 용혈현상을 억제하는 경향을 보였으며 10 mM에서는

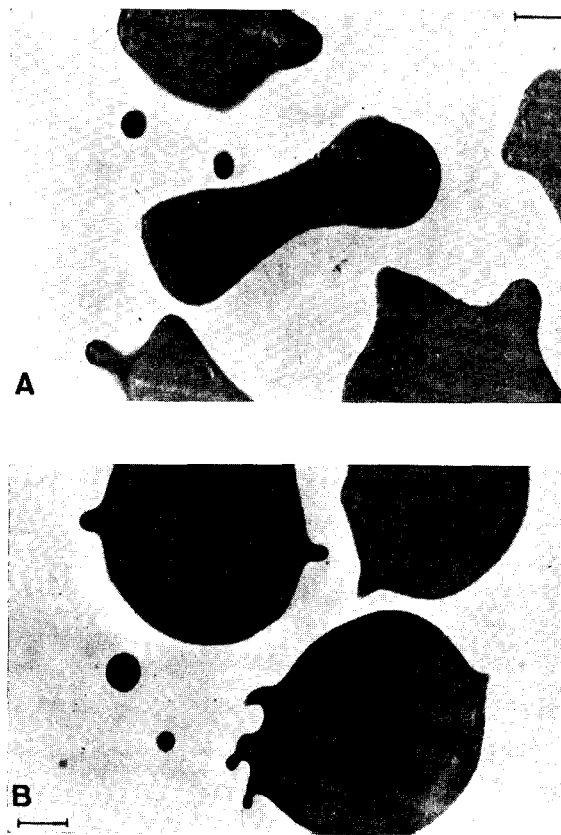


Fig. 1. Electron microscopic pictures of erythrocytes treated with benzyl alcohol at concentration of 100 mM (B) and without benzyl alcohol (A). (bar 1um)

40 mM에서 보다 억제하는 정도가 더 컸다.

**3) Benzyl alcohol이 적혈구의 삼투성 용적변화 (osmotic volume change)에 미치는 영향 :** 그림 3에서 볼 수 있는 바와 같이 10 mM 및 40 mM의 benzyl alcohol을 첨가한 군에서 적혈구 용적이 의의있게 컸다. 또한 benzyl alcohol을 첨가한 실험군에서는 "non-solvent volume"도 증가하였다.

### 2. Benzyl alcohol이 심근 세포막의 Ca<sup>++</sup> 이동에 미치는 영향

흰 쥐의 좌심방 근육으로부터 묘기한 Bowditch & Woodworth staircase 현상은 그림 4에서 보는 바와 같다. Benzyl alcohol의 영향을 관찰하기 위하여 1.

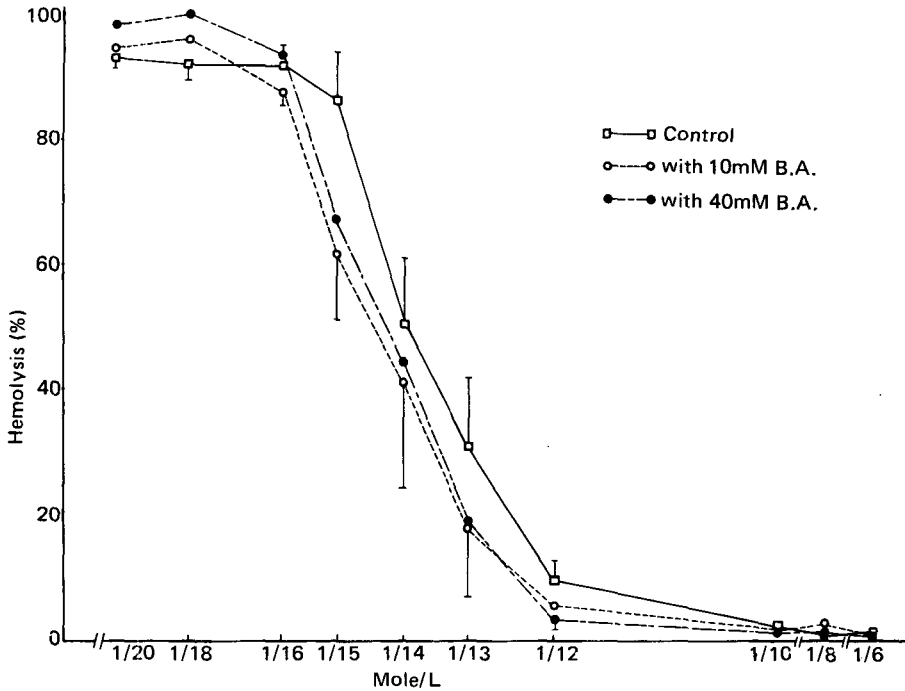


Fig. 2. The effect of benzyl alcohol on osmotic hemolysis of human red blood cell in hypotonic NaCl solution. Vertical bars represents standard errors. B. A. represents benzyl alcohol.

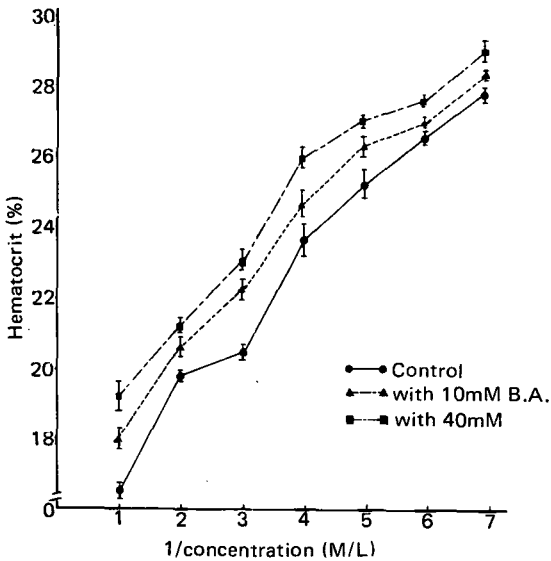


Fig. 3. The effect of benzyl alcohol on osmotic volume change of human red blood cell in hypertonic NaCl solution. B. A. represents benzyl alcohol. Vertical bars represents standard errors.

43 mM, 2.86 mM 및 4.29 mM을 incubation medium 내에 첨가한 군에서는 그림 4 및 5에서 볼 수 있는 바와 같이 Bowditch 및 Woodworth Staircase 현상을 모두 억제하였으며 1.43 mM에 의하여 23% 그리고 2.86 mM에 의하여 39% 및 27% 감소를 보였다.

### 3. Benzyl alcohol이 세포막의 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도에 미치는 영향

1) Benzyl alcohol이 적혈구막의 Ca<sup>++</sup>-ATP 활성도에 미치는 영향 : 이 결과는 그림 6에 보이고 있는데 대조군의 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도가 10.96±1.74 μmole pi/mg protein/hr인데 비하여, incubation용액내에 benzyl alcohol을 5 mM, 10 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM 및 100 mM 첨가한 군에서는 활성도가 각각 11.44±2.56, 10.68±2.58, 8.78±1.96, 8.92±1.94 및 0.92±0.40 μmole pi/mg protein/hr이었다. 여기서 보는 바와 같이 benzyl alcohol은 낮은 농도(5 mM)에서는 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도를 약간 증가시키는 경향이 있었으나 40 mM 이상 농도에서는 현

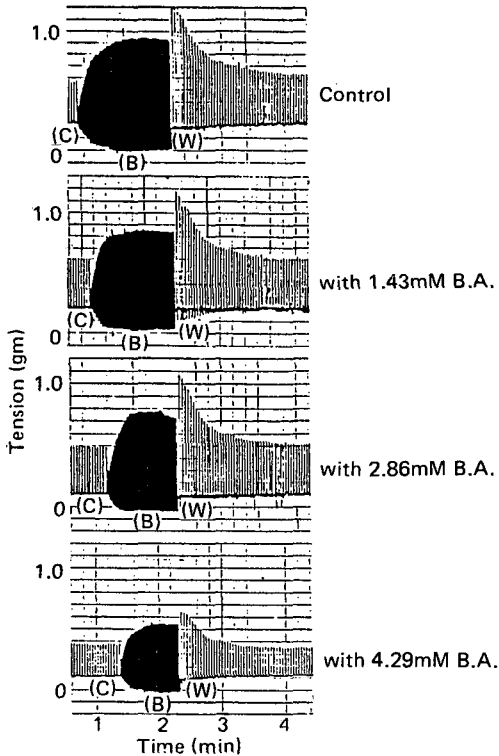


Fig. 4. Typical pictures showing the effect of benzyl alcohol on the isometric tension of rat left auricle muscle.  
B. A. represents benzyl alcohol.  
(B) represents Bowditch Staircase.  
(C) represents normal tension.  
(W) represents Woodworth Staircase.

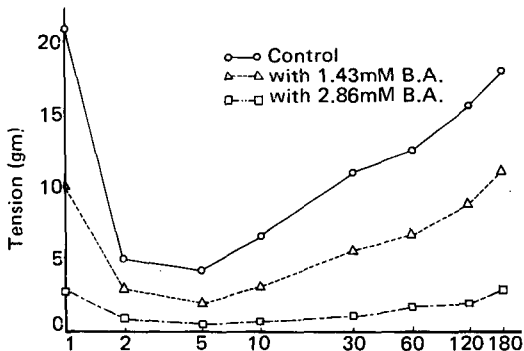


Fig. 5. The effect of benzyl alcohol on the interval-tension relationship of rat left auricle.  
B. A. represents benzyl alcohol.

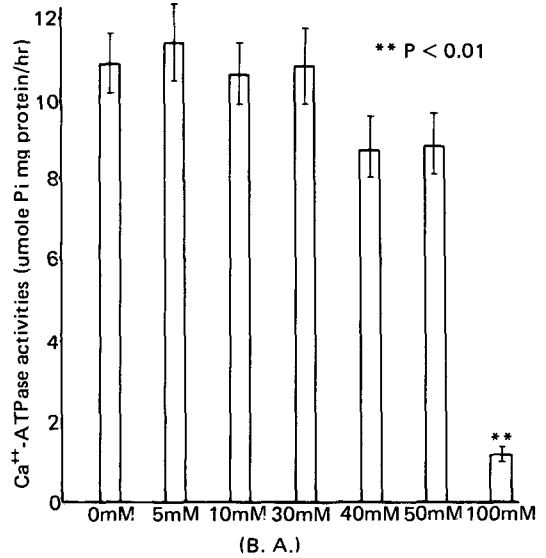


Fig. 6. The effect of benzyl alcohol on the  $Ca^{++}$ -ATPase activities of human red blood cell membranes. Vertical bars represents standard errors.  
B. A. represents benzyl alcohol.

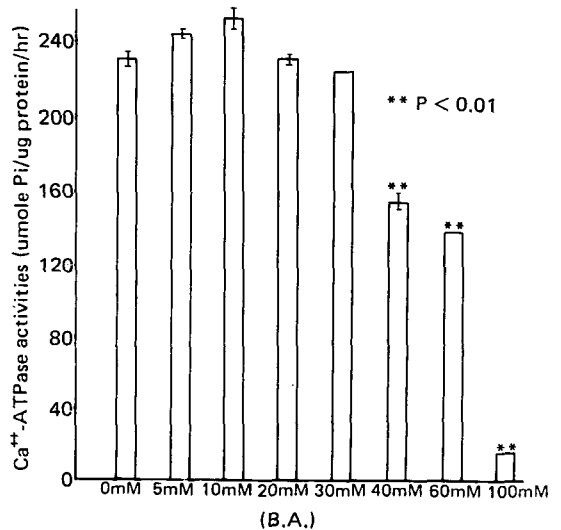


Fig. 7. The effect of benzyl alcohol on the  $Ca^{++}$ -ATPase activities of rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.  
B. A. represents benzyl alcohol.  
Vertical bars represents standard errors.

저히 억제시켰다.

2) Benzyl alcohol이 골격근의 S.R.에서  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도에 미치는 영향 : 이 결과는 그림 7에서 보는 바와 같이 대조군의  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도가  $233.86 \pm 6.50 \mu\text{mole pi/mg protein/hr}$ 인데 비하여 benzyl alcohol을 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM 및 100 mM 첨가한 군에서는 활성도가 각각  $243.64 \pm 3.98$ ,  $250.14 \pm 10.08$ ,  $233.06 \pm 4.48$ ,  $226.48 \pm 0$ ,  $154.78 \pm 7.94$ ,  $139.92 \pm 0$  및  $14.71 \pm 0 \mu\text{mole pi/mg protein/hr}$ 로 benzyl alcohol의 농도가 낮을 때 (5~20 mM)에는  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성도가 증가하였으나 40 mM 이상에서는 현저히 억제되었다.

## 고 찰

세포막은 인지질(phospholipid)의 이중층(bilayer)으로 되어 있고 여기에 콜레스테롤 및 각종의 단백질이 막 사이에 끼어 있는 구조를 갖추고 있으며 (Bretscher, 1985), 세포막을 구성하고 있는 지질과 단백질은 막의 안과 밖에 비대칭으로 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 (Harrison & Lunt, 1980). 이들에 의하면 인지질 중 amines을 함유하고 있는 phosphatidylethanolamine과 phosphatidylserine은 주로 bilayer 중에서 cytoplasmic monolayer에 분포하고 있다. Sheetz & Singer (1975)에 의하면 사람의 적혈구막은 전형적인 세포막의 비대칭 구조를 갖추고 있어서 지질의 비대칭적 분포 때문에 안쪽의 monolayer와 바깥의 monolayer의 electrostatic charge가 달라 여러가지 약물이 적혈구막에 결합할 때 약물의 특성에 따라 결합하는 부위가 다르므로 적혈구의 형태가 다르게 변한다고 한다 (bilayer couple hypothesis). 따라서, 이 가설에 의하면 음하전을 띄는 약물들은 적혈구막의 바깥층에 결합하여 이 막을 안쪽 막에 비하여 선택적으로 팽창시키므로 discocytic한 적혈구를 거치상(crenated)의 echinocytic한 형태로 변화시키며, 반대로 양하전을 띄는 약물들은 적혈구막 안쪽에 결합하여 이 막을 선택적으로 팽창시키므로 discocytic한 적혈구를 컵모양의 stomatocytic한

형태로 변화시킨다고 한다.

국소마취제로 알려진 benzyl alcohol은 중성물질이지만 이것이 세포막과 결합하면 50 mM이하의 낮은 농도에서는 적혈구의 형태를 stomatocytic한 형태로 변화시키고 그 이상의 농도에서는 echinocytic한 형태로 변화시킨다고 한다 (Chabanel et al., 1985). 이는 낮은 농도의 benzyl alcohol은 적혈구막의 안쪽에 선택적으로 결합하며, 높은 농도의 benzyl alcohol은 적혈구막 바깥에 결합함을 보이는 것으로서 이와 같은 형태의 변화는 적혈구막의 생리적 기능에도 영향을 미칠 것으로 짐작된다.

먼저, 본 실험에서는 benzyl alcohol이 적혈구의 형태에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 20 mM 및 40 mM의 benzyl alcohol은 적혈구의 형태를 stomatocytic한 형태로 변화시켰으며 80 mM의 benzyl alcohol은 echinocytic한 형태로 변화시켰다. 이 실험결과는 Chabanel et al. (1985)의 실험성과 잘 일치하였고 Mohandas et al. (1979)이 세포막의 안쪽막에 주로 삽입되는 lysophosphatidylcholine으로 적혈구를 처리했을 때 stomatocytic한 형태로 변했다는 실험성과도 일치하는 결과라 할 수 있다. 낮은 농도의 benzyl alcohol이 왜 세포막의 안쪽 monolayer에 선택적으로 결합하는지는 확실히 알 수 없다. 중성물질이 세포 안으로 들어가면 안쪽막의 음전하 크기가 감소될 수는 있지만, 이것과 benzyl alcohol의 안쪽막의 선택적 결합과는 어떤 연관이 있는지 확실히 알 수 없다. 다만 가능한 설명은 benzyl alcohol이 안쪽막에 있는 인지질이나 기타 물질에 대한 친화도가 바깥막의 친화도에 비해 크기 때문이라고 말할 수 있다. 이와같이 benzyl alcohol이 적혈구의 형태를 변화시킨다면 세포막에서의 단순한 물리적인 현상으로 알려져 있는 적혈구의 용혈현상 및 삼투성 용적 변화에도 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이들 실험을 위해서 신선한 사람혈액을 채혈하여 원심분리 방법으로 적혈구만 분리해 적혈구 부유액을 만들고 benzyl alcohol이 저장성 용액(hypotonic solution)에서의 fragility 및 고장성 용액(hypertonic solution)에서의 삼투성 용적에 미치는 영향을 관찰하였다. Benzyl alcohol이 적혈구의 삼투성 용혈현상에 미치는 영향은 그림 2에 나



타나 있는 바와 같이 용혈현상을 억제하였다. 이는 Pilwat et al.(1975)의 실험결과와 잘 일치하는 성적이다. Benzyl alcohol이 적혈구의 삼투적 용적 변화에 미치는 영향은 그림 3에 나타냈는데, benzyl alcohol은 10 mM 및 40 mM에서 공히 높은 Hct를 보였다. 이는 benzyl alcohol이 적혈구막을 통한 물의 이동을 억제함으로써 적혈구의 용적을 유지하고 있다고 볼 수 있는데 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 benzyl alcohol을 가한 군에서 “non-solvent volume”이 큰 것으로 보아 benzyl alcohol은 단순히 물의 이동만 억제하였던지 혹은 물의 이동과 반대방향으로 용질의 투과를 조장한 결과라고 볼 수 있다. 이와같이 benzyl alcohol이 적혈구 내에 용질과 수분에 의한 용적을 높게 유지함에도 불구하고 용혈현상을 억제하는 것은 benzyl alcohol의 적혈구막에 대한 “Stabilizing effect” (Pilwat et al., 1975)에 의하여 “mean critical hemolytic volume”이 증가하기 때문이 아닌가 생각된다. 또한 benzyl alcohol이 적혈구막의 “disordering effect” (Glader & Sullivan, 1979)에 의하여 저장성 용액으로 부터의 물 및 전해질의 이동을 억제하기 때문에 용혈현상을 억제할 수도 있음을 배제할 수 없다. 한편, benzyl alcohol이 세포막을 통한  $Ca^{++}$  이동에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하기 위하여 심장근육 표본에서 Bowditch & Woodworth Staircase 현상에 미치는 영향을 측정하였더니 그림 4 및 5에서 보는 바와 같이 공히 억제되었다. 이는 benzyl alcohol이 세포막을 통한  $Ca^{++}$  유입을 억제할 뿐 아니라 SR에서의  $Ca^{++}$  섭취도 억제함을 보이는 결과다. 또한 benzyl alcohol은 적혈구막에서 분리한  $Ca^{++}$ -ATPase와 골격근 S. R.에서의  $Ca^{++}$ -ATPase도 공히 억제하였다(그림 6 및 7). 특히 benzyl alcohol은 10 mM이하의 농도에서의  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성도를 증가시키는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 것은 아니었고, 그 이상의 농도에서는 모두 억제하였다. 이는 Gordon et al.(1980)이 benzyl alcohol의 basal adenylate cyclase 활성도에 미치는 영향을 보고한 것과 일치하는 결과이다.

이상의 실험성적 등으로 미루어 보아 Benzyl alcohol은 세포막을 구성하고 있는 지질의 이중층

막 내외에 선택적으로 결합하여 세포막의 형태를 변화시킴으로써 세포막 내에 있는 단백질의 기능에 영향을 주고 있음을 암시하는 것이며 이는 아마도 세포막을 구성하는 지질의 fluidity를 변화시키기 때문이 아닌가 생각된다. 이를 뒷받침하는 실험결과로 benzyl alcohol은 여러조직의 세포막에서 fluidity를 증가시킨다는 보고가 있다(Brasitus & Schachter, 1980; Carriere & LeGrimellec, 1986; Chabanel et al., 1985; Giraud et al., 1981; Gordon et al., 1980; Houslay & Gordon, 1983; Martin et al., 1985)이 중에서 benzyl alcohol이 ( $Na^{+}+K^{+}$ )-ATPase(Giraud et al., 1981; Chabanel et al., 1985) 및  $Mg^{++}$ -ATPase(Gordon et al., 1980)등의 활성도를 억제시켰다는 보고는 본 실험성적과 일치하였으나 benzyl alcohol이 fluidity를 증가시킴에도 불구하고 adenylate cyclase 활성도를 증가시켰다는 보고(Brasitus & Schachter 1980; Gordon et al., 1980; Houslay & Gordon, 1983; Martin et al., 1985)와는 상이한 실험성적이다. Benzyl alcohol이 공히 세포막의 fluidity를 증가시킴에도 불구하고 어떤 기전으로 어떤 효소는 억제하고 다른 효소는 활성화시키는 지 확실히 알 수 없으나 Giraud et al.(1981)은 40 mM의 benzyl alcohol이 적혈구막에 존재하는 ( $Na^{+}+K^{+}$ )-ATPase의 세포막 내부에 있는 부위의 친화도에는 영향을 미치나 외부에 노출된 부위의 친화도에는 영향을 미치지 못한다는 보고에 비추어 볼 때 아마도 효소 단백질이 세포막에서의 배열(orientation)과 밀접한 관계가 있을 것으로 보여진다.

즉, in vivo에서  $Ca^{++}$ -ATPase 단백질은 분자량이 약 110,000 dalton정도 되는 monomer가 dimer 구조를 이루고 있는것으로 알려져 있고(Hymel et al., 1984), 110,000 dalton의 분자 중 55,000 dalton에 해당되는 부위는 세포질 내에 노출되어 phosphorylation이 일어나는 부위로서  $Ca^{++}$ 에 대한 친화도가 큰 것으로 밝혀져 있다(Shamoo, 1978). 따라서 benzyl alcohol이 세포막에 결합하여 막이 팽창할 때  $Ca^{++}$ -ATPase 분자의 세포질 쪽으로 돌출된 부위에 구조적인 변화(conformational change)를 일으켜  $Ca^{++}$ 에 대한 친화도를 감소시킴으로써 활성도에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

## 결 론

적혈구막의 안쪽막에 선호적으로 결합하여 형태 및 적혈구막의 fluidity에 영향을 미치는 benzyl alcohol은 세포막의 구조 뿐 아니라 세포막에 존재하는 단백질의 기능에도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

본 실험에서는 적혈구의 형태 및 구조에 미치는 영향을 규명하기 위하여 benzyl alcohol로 처리한 적혈구의 형태를 직접 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하였고 동시에 benzyl alcohol이 적혈구의 삼투성 용혈현상 및 삼투성 용적변화에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 benzyl alcohol이 세포막의 기능에 미치는 영향을 규명하기 위하여 생체세포의 기능을 조절하는 가장 중요한 물질의 하나인  $Ca^{++}$  이온의 세포막을 통한 이동에 미치는 영향을 측정하였고 그 기전을 이해하기 위하여 적혈구막과 골격근 S.R.에서 분리한  $Ca^{++}$ -ATPase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 실험성적은 다음과 같다.

1) Benzyl alcohol을 20 mM, 40 mM 및 80 mM 이 되게 적혈구 부유액에 첨가한 후 적혈구의 모양을 관찰하였더니 20 mM 와 40 mM 에서 stomatocytic한 형태의 적혈구가 나타났고, 80 mM 농도에서는 echinocytic한 형태의 적혈구가 다수 인견되었다.

2) Benzyl alcohol은 적혈구의 삼투성 용혈 및 삼투성 용적 변화를 모두 억제하였다.

3) Benzyl alcohol은 흰쥐의 심장근에서 Bowditch staircase 현상 및 Woodworth staircase 현상을 모두 억제하였다.

4) Benzyl alcohol은 Hajdu(1969) 등의 방법에 의한 자극간격의 변화에 따른 장력의 크기도 모두 감소시켰다.

5) Benzyl alcohol은 5 mM에서 적혈구막의  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성도를 약간 증가시키는 경향이 있었으나 통계적으로 의의있는 것이 아니었고 10 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM 및 100 mM 농도에서는 모두  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도를 억제시켰다.

6) Benzyl alcohol은 5 mM 및 10 mM에서 골격

근 S.R.의  $Ca^{++}$ -ATPase의 활성도를 약간 증가시키는 경향이 있었으나 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM 및 100 mM 농도에서는 모두  $Ca^{++}$ -ATPase 활성도를 억제하였다.

이상의 실험결과들은 benzyl alcohol이 세포막의 구조와 세포막의 기능에 영향을 미치고 있음을 보이는 것으로써, benzyl alcohol은 세포막의 bilayer 중 안쪽의 monolayer에 선호적으로 결합하여 안쪽의 monolayer가 팽창하면서 구조적인 변화를 일으킬 때에 세포막을 가로질러 이동하는 여러 물질들의 이동에 영향을 주고 있음을 암시한다. 이는 단순한 물리적인 현상으로 알려져 있는 세포막의 물에 대한 투과도 뿐 아니라 운반체 단백질이나 특수한 경로를 거쳐 이동하는  $Ca^{++}$ 의 이동에도 영향을 미치게 되고 이러한 작용은 단백질의 세포막에서의 배열과 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. 즉  $Ca^{++}$ -ATPase는 그 활성부위가 세포질 쪽으로 많이 돌출되어 있으므로 benzyl alcohol이 세포질 쪽의 monolayer에 결합하여 활성부위의 구조적인 변화를 일으키기 때문에 그 활성도가 억제되는 것으로 사료된다.

## REFERENCES

Bessis M (1973). Red Cell Shapes. An illustrated classification and its rationale. In: Bessis M, Weed RI & Leblond PF (ed) *Red Cell Shape*. Berlin, Springer-Verlag, p 1-25

Brasitus TA & Schachter D (1980). Lipid dynamics and lipid protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry* 19, 2763-2769

Bretscher MS (1985). The molecules of the cell membrane. *Sci Am* 253 (4), 100-109

Carriere B & LeGrimellec C (1986). Effects of benzyl alcohol on enzyme activities and D-glucose transport in Kidney brush-border membranes. *Biochem Biophys Acta* 857, 131-138

Cha YN, Shin BC & Lee KS (1971). Action uptake of  $Ca^{++}$  and  $Ca^{++}$ -activated  $Mg^{++}$ -ATPase in red cell membrane fragment. *J Gen Physiol* 57, 202-215

Chabanel A, Abbott RE, Chien S & Schachter D (1985). Effect of benzyl alcohol on erythrocyte shape, mem-

- brane hemileaflet fluidity and membrane viscoelasticity. *Biochim Biophys Acta* 816, 142-152
- Deuticke B (1968). Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes in ionic environment. *Biochim Biophys Acta* 163, 494-500
- Dodge JT, Mitchell C & Hanahan DJ (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100, 119-130
- Giraud F, Claret M, Bruckdorfer KR & Chailley B (1981). The effects of membrane lipid order and cholesterol on the internal and external cationic sites of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump in erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 647, 249-258
- Glader BE & Sullivan DW (1979). Erythrocyte disorders leading to potassium loss and cellular dehydration. In: Lux SE, Marchesi VT & Fox CF (ed) *Normal and abnormal red cell membranes*. Alan R. Liss Inc. New York, p 503-513
- Gordon LM, Sauerheber RD, Esgate JA, Dipple I, Marchmont RJ & Houslay MD (1980). The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J Biol Chem* 255, 4519-4527
- Hah JS, Kang BS & Kang DH (1978). Effect of Panax-ginseng alcohol extract on cardiovascular system. *Yonsei Med J* 19, 11-18
- Hajdu S (1953). Mechanism of staircase and contracture in ventricular muscle. *Am J Physiol* 174, 371-380
- Hajdu S (1969). Mechanism of the woodworth staircase phenomenon in heart and skeletal muscle. *Am J Physiol* 216, 206-214
- Harrison R & Lunt GG (1980). Membrane asymmetry. In: *Biological membranes*. John Wiley and Sons, New York, p 102-129
- Houslay MD & Gordon LM (1983). The activity of adenylate cyclase is regulated by the nature of its lipid environment. In: Kleinzeller A & Martin BR (ed) *Current Topics in Membranes and Transport*. Vol 18, Academic Press, New York, p179-231
- Hymel L, Maurer A, Berenski C, Jung CY & Fleischer S (1984). Target size of calcium pump protein from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 259, 4390-4895
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Martin KJ, McConkey CL & Strokes TJ (1985). Effects of benzyl alcohol on PTH receptor-adenylate cyclase system of canine kidney. *Am J Physiol* 248, E31-E35
- Matayoshi ED (1980). Distribution of shape-changing compounds across the red cell membrane. *Biochemistry* 19, 3414-3422
- Michell B (1983).  $\text{Ca}^{++}$  and protein kinase C: two synergistic cellular signals. *TIBS* 8, 263
- Miller KW (1977). Towards the molecular bases of anesthetic action. *Anesthesiology* 46, 2-4
- Mohandas N & Feo C (1975). A quantitative study of the red cell shape changes produced by anionic and cationic derivatives of phenothiazines. *Blood Cells* 1, 375-384
- Mohandas N, Phillipas WM & Bessis M (1979). Red blood cell deformability and hemolytic anemias. *Semin Hematol* 16, 95-114
- Peter JB & Worsfold M (1969). Muscular dystrophy and other myopathies: Sarcotubular vesicles in early disease. *Biochem Med* 2, 364
- Pilwat G, Zimmermann U & Riemann F (1975). Dielectric breakdown measurements of human and bovine erythrocyte membranes using benzyl alcohol as a probe molecule. *Biochim Biophys Acta* 406, 424-432
- Shamoo AE (1978). Reconstitution of the 20,000 dalton fragment of  $(\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++})\text{-ATPase}$  in phosphatidylcholine vesicles. *Developments in Cell Biology* 4, 59-63
- Sheetz MP & Singer SJ (1975). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 4456-4461