

三和散이 大腦皮質 microsome分劃에서 Na-K-ATPase活性에 미치는 影響

金吉變* · 鄭智天*

ABSTRACT

Effect of Sam Hwa San on Na-K-ATPase Activity in Microsomal Fraction of Rabbit Cerebral Cortex

Kim Gil Seop, Jeong Ji Cheon

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Dong Guk University

The effect of Sam Hwa San on the Na-K-ATPase activity was evaluated in microsomal fraction prepared from rabbit cerebral cortex to determine whether Sam Hwa San affects Na-K-ATPase activity of nervous system.

Sam Hwa San markedly inhibited the Na-K-ATPase activity in a dose-dependent manner with an estimated I_{50} of 0.12%. Optimal pH for the Na-K-ATPase activity was at 7.5 in the presence or absence of Sam Hwa San. The degree of inhibition by the drug more increased at acidic and alkalic pHs than neutral pH. Kinetic studies of substrate and cationic activation of the enzyme indicate classic noncompetitive inhibition fashion for ATP, Na and K, showing significant reduction in V_{max} without a change in K_m . Dithiothreitol, a sulfhydryl reducing reagent, partially protects the inhibition of Na-K-ATPase activity by Sam Hwa San.

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

Combination of Sam Hwa San and ouabain showed higher inhibition than cumulative inhibition.

These results suggest that Sam Hwa San inhibits Na-K-ATPase activity in central nervous system by reacting with, at least a part, sulfhydryl group and ouabain binding site of the enzyme protein, but with different binding site from those of ATP, Na and K.

1. 緒 論

大部分의 살아 있는 動物 細胞에서는 細胞膜에 存在하고 있는 Na-pump에 의하여 Na이 細胞內에서 밖으로 移動되고 있어 細胞膜을 境界로 Na 濃度는 外部가 内部보다 높은 水準에서 維持되고 있다.²⁷⁾ 이러한 Na의 移動으로 神經細胞나 心筋細胞가 興奮을 傳達할 수 있고, 筋肉이 收縮을 할 수 있는 등³⁹⁾ 여러가지 生理的 機能이 遂行되고 있으며, 또한 細胞容積이 正常 크기로 維持되고³⁷⁾ 體液의 Na 濃도가 一定하게 調節되고 있다.²⁹⁾

Skou⁴⁸⁾는 개의 末梢 神經細胞에서 Na과 K에 의하여 活性化되는 adenosine triphosphatase (ATPase) 즉, Na-K-ATPase가 存在하며 이 酵素係가 Na과 K의 移動에 關與하는 酵素일 것이라고 主張한 以來, Post 등⁴³⁾과 Dunham과 Glynn³⁴⁾도 赤血球膜에서 Na-K-ATPase가 Na과 K의 能動的 移動에 關與함을 立證하였다.

그 以後 Na-K-ATPase의 特徵을 보이는 酵素係가 여러 種類의 組織^{30,40,46)}에서 發見되었으며, 특히 Bonting 등³⁰⁾은 家猫와 사람의 39 種類의 組織中에서 대부분 이 酵素係가 存在하고 있음을 밝혔으며, 이들 組織中 특히 腦, 腎臟, 脈絡叢 等 分泌機能이 旺盛한 組織에서 높은 活性을 나타냄을 觀察하였다.

또한 Skou⁴⁷⁾는 Na-K-ATPase가 Na-K-pump와 同一한 것으로 主張하였으며, Jorgensen 등³⁸⁾도 赤血球에서 免疫學的으로 觀察한 결과 Na과 K 移動에 關與하는 ATPase는 Na-pump와 同一한 것임을 밝혔다.

Na-K-ATPase가 直接으로나 間接적으로 여러가지 神經末梢에서 神經傳達物質의 遊離에 關係할 것이라는 證據들이 나타나고 있는데, Na-K-ATPase를 特異하게 抑制하는 藥物로 잘 알려진 ouabain⁴⁵⁾을 處理한 結果, 쥐의 大腦皮質^{31,36,53)}, 小腦皮質⁵²⁾, caudate nucleus의 神經末梢⁵³⁾에서 Acetylcholine의 遊離가 增加됨이 알려졌다. 또한 細胞 外部에 K⁺을 除去했을 때 Auerbarch 神經叢의 神經末梢에서 Acetylcholine의 遊離가 나타남을 確認하였다.^{42,50,54)}

이러한 結果들을 통해서 神經細胞의 Na-K-ATPase 活性의 抑制는 神經末梢에서 Acetylcholine의 遊離를 일으키는 것을 알 수가 있으며 Na-K-ATPase 活性이 神經細胞에서 Acetylcholine과 같은 化學的 媒介物質의 遊離에 關係하고 있음을 알 수가 있다.

Na-K-ATPase 活性과 관련된 韓醫學에서의 實驗報告로 安¹⁰⁾은 莎芎散이 家兔 大腦皮質의 Na-K-ATPase 活性을 抑制한다고 하였으며, 全¹²⁾은 勝金散이 心臟의 Na-K-ATPase 活性을 增加시킨다고 하였다. 三和散에 對한 實驗으로

鄭¹⁴⁾이 腎臟의 Na-K-ATPase 活性을 抑制한다고 하였으나, 神經組織의 Na-K-ATPase 活性에 어떤 影響을 미치는 지는 明確하지 않다.

이에 著者는 三和散에 의한 氣의 循環調節이 大腦와 自律神經系에도 影響을 줄 것으로 보아 大腦皮質의 Na-K-ATPase 活性에 對한 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에 使用된 藥材는 市中에서 上等品을 購入하고 精選하여 使用하였다. 三和散의 各 藥材의 分量은 文獻에 따라 差異가 있었으나 許⁶⁾의 東醫寶鑑에 記載된 分量을 基準으로 하였으며, 1 貼 分量은 다음과 같다.

川芎	Cindii Rhizoma	4.0g
沈香	Aquilariae Lingnum	2.0g
蘇葉	Perillae Folium	2.0g
大腹皮	Arecae Pericarpium	2.0g
羌活	Angelicae Koreanae Radix	2.0g
木瓜	Chaenomelis Fructus	2.0g
木香	Helenii Radix	1.2g
白朮	Atractylis Rhizoma	1.2g
檳榔	Arecae Semen	1.2g
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	1.2g
甘草(炙)	Glycyrrhizae Radix	1.2g
Total		20.0g

2) 動物

體重 2Kg 內외의 家兔를 암수 區別 없이 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

三和散 5貼 分量 100g을 細切하여 1000ml round flask에 넣고 蒸溜水 500ml를 加한 다음 冷却器를 附着하여 2時間 동안 加熱 煎湯하고 2回 吸引 濾過한 濾液을 rotary vacuum evaporator에 넣어 減壓濃縮시켜 엑기스 粉末 21g을 얻어 本 實驗에 必要한 濃度로 稀釋하여 使用하였다.

2) 大腦皮質에서 microsome 分割의 分離

大腦皮質에서 microsome 分割은 De Robertis 등의 方法²⁴⁾으로 分離하였다. 간단히 설명하면 다음과 같다. 家兔 耳靜脈에 10cc 정도의 공기를 주입하여 家兔를 죽인 직후 腦를 들어내어 大腦皮質을 分離하고 0.25M sucrose와 20mM Tris-HCl(pH 7.5)이 들어 있는 冷한 溶液으로 1:10(W/V)의 비율로 均等質을 만들어 900xg에서 10분간 원심분리하여 침전물은 버리고 上層液을 얻어 11,500xg에서 20분간 원심분리한 후 上층액만을 다시 100,000xg에서 30분간 원심침전하여 microsome 分割을 분리하여 上記 溶液에 浮遊시킨 후 0℃의 냉장고에 저장하여 使用하였다.

이와 같이 준비된 均等質內 단백질 함량은

牛血清알부민을 標準 溶液으로 하여 Lowry 등의 방법²⁵⁾으로 測定하였다.

3) Na-K-ATPase活性的 測定

大腦皮質 microsome 分割內 ATPase活性은 incubation 溶液內 ATP를 添加한 後 ATP로부터 遊離되는 無機磷酸(Pi)의 濃度を 測定하여 酵素의 活性度로 하였다.

總 ATPase活性(Na-K-ATPase + Mg-ATPase)을 測定하기 위한 incubation 溶液의 造成은 3mM ATP, 3mM Mg, 100mM Na, 10mM K, 100mM Tris-HCl(pH 7.4)로 하였고 여기에 microsome 分割을 0.2ml 加하여 最終量이 1ml 되게 하였으며 Mg-ATPase 活性은 上記 造成中 Na과 K이 없는 상태에서 0.1mM Ouabain 存在時 測定하였고 總 ATPase活性과 Mg-ATPase活性의 차이를 Na-K-ATPase活性으로 하였다.

ATP가 없는 incubation 溶液을 37°C에서 30분간 preincubation한 後 ATP를 加하여 反應을 시작하였으며 10분 동안 incubation한 後 여기에 冷한 11.67% HClO₄ 0.4ml를 加하여 反應을 停止시켰다. 그리고 Na-K-ATPase 活性에 對한 三和散의 效果를 觀察할 때는 藥物을 preincubation 溶液內에 添加하였으며, ATP로부터 遊離되는 無機磷酸의 濃度は Fiske 및 SubbaRow의 방법²⁵⁾으로 측정하였다.

4) 資料分析 및 統計處理

酵素力學的 分析을 위한 實驗에서 酵素活性의 最大速度(Vmax)와 Michaelis 常數(Km)는 Sigma 會社에서 開發한 program인 Enzfitter를

사용하여 computer로 分析하여 얻었다. 두 平均值間의 有意性 檢定은 Student't-test를 이용하였으며, P< 0.05 일 때 유의한 것으로 判定하였다.

III. 實驗成績

1. Na-K-ATPase活性에 對한 三和散 濃度變化의 效果

家兔 大腦皮質의 Na-K-ATPase活性은 三和散의 濃도에 比例하여 抑制되어 0.1% 濃度에서 約 45% 抑制되었으며, 2% 濃度에서는 酵素活性이 完全히 抑制되었다. 酵素活性을 50% 抑制하는데 必要한 藥物의 濃度(I₅₀)는 0.12%였다. (Fig. 1)

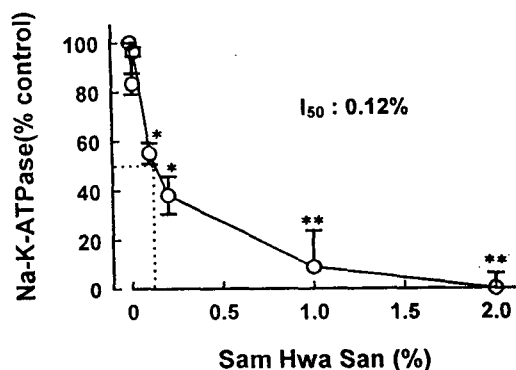


Fig. 1. Effect of Sam Hwa San concentration on Na-K-ATPase activity in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

I₅₀ indicates the concentration of Sam Hwa San for 50% inhibition.

Data are mean±SE of four experiments. *P<0.05; **P<0.01

2. 藥物處理 時間에 다른 效果

酵素活性에 대한 藥物의 抑制效果가 處理時間에 따라 달라지는 지를 觀察한 結果, 藥物을 10分동안 處理했을 때 藥物을 前處理하지 않고 직접 incubation 溶液內 添加했을 때와 비교하여 有意하게 抑制되었으며, 處理時間이 60分까지 延長됨에 따라 抑制程度는 比例하여 增加하였다.(Fig. 2)

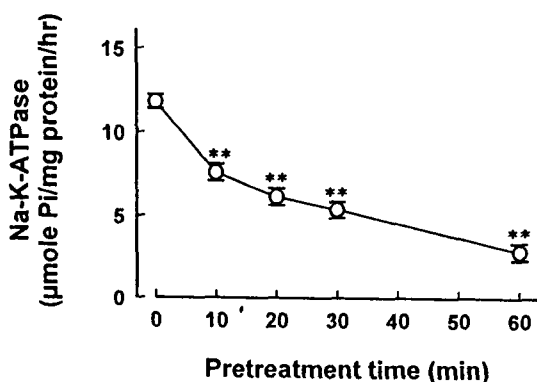


Fig. 2. Effect of pretreatment time on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Sam Hwa San(0.1%) in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Data are mean±SE of three experiments. **p<0.01

3. 溶液內 pH變化的 效果

Incubation 溶液內 pH를 6.0에서 8.5까지 變化시키고 pH의 變化에 따른 三和散의 抑制效果를 觀察하였다. 藥物이 있을 때나 없을 때 Na-K-ATPase의 最大 活性은 pH 7.5에서 나타났으며, 溶液의 pH가 7-8 範圍內에서보다 6.5와 8.5에서 그 抑制程度가 增加하는 樣相을 보였다. 즉 pH 7-8 範圍에서는 抑制程度가 約 50-60%인데 비해 pH가 6.5와 8.5일 때는 抑制

程度가 約 75%로 나타났으며, pH 6.0에서는 藥物이 있을 때나 없을 때 酵素의 活性이 거의 나타나지 않았다.(Fig. 3)

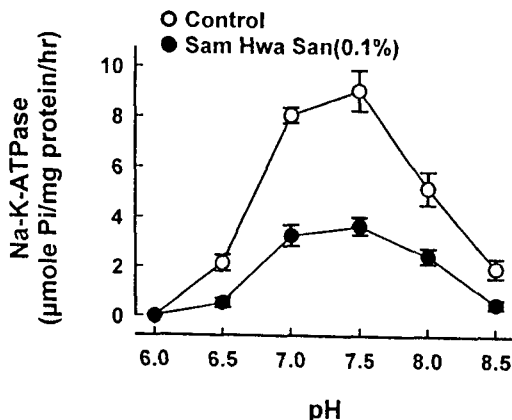


Fig. 3. Effect of medium pH on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Sam Hwa San(0.1%) in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Hepes/Tris buffers were used at range of pH 7.0-8.5 and Mes/Tris buffer at pH 6.5 and 6.0.

Data are mean±SE of three experiments.

4. 酵素力學的 分析

Na-K-ATPase는 ATP를 分解하여 Na과 K의 能動的 移動에 필요한 에너지를 供給하는 酵素이기 때문에 이 酵素蛋白質에는 ATP 뿐만 아니라 Na과 K의 結合部位를 가지고 있다.

따라서 어떤 藥物이 이들의 結合部位에 直接 結合한다면 이들이 酵素와 結合하는 것이 妨害되기 때문에 酵素의 活性이 抑制될 것이며, 이와 같은 경우에는 酵素에 대한 親和性이 減少하게 되어 Km값이 增加하게 된다.

또한 이들의 結合部位와는 다른 部位에 結合

하여 酵素의 活性이 抑制되었다면 Km값에는 변화 없이 最大速度(Vmax)가 감소하게 될 것이다. 이와 같이 酵素力學的 分析을 통하여 抑制藥物의 作用機轉을 밝힐 수가 있다.²⁶⁾

1) ATP의 濃度變化에 따른 效果

Incubation 溶液內의 다른 條件을 一定하게 維持시키고 다만 ATP 濃度만을 0.2mM에서 3mM까지 變化시킨 後 三和散이 ATP에 의한 Na-K-ATPase 活性에 미치는 影響을 관찰하였다.

ATP 濃度가 增加함에 따라 酵素活性이 直線으로 增加하지 않고 曲線으로 增加하였으며, 3mM 濃度에서의 酵素活性이 2mM일 때와 比較하여 더욱 增加하지 않음으로써 飽和現像을 나타내었다.

이들 成績을 分析한 結果 酵素活性의 最大速度(Vmax)는 0.1% 濃度의 藥物이 存在할 때 14.90에서 7.81 μ mole Pi/mg protein/hr로 유의하게 減少하였다.

그러나 Michaelis 常數(Km) 값은 藥物이 存在할 때나 없을 때 유의한 變化를 보이지 않았다.(Fig. 4)

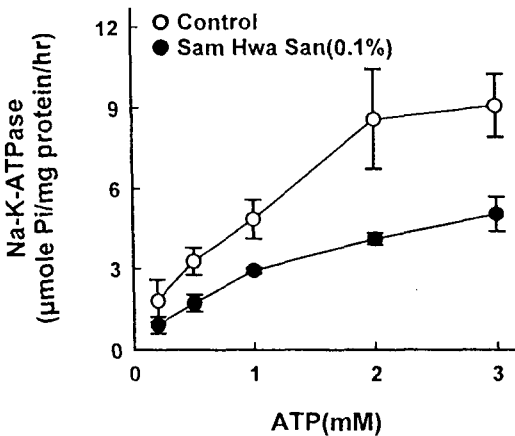


Fig. 4. Effect of ATP concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Sam Hwa San(0.1%) in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Data are mean \pm SE of four experiments.

Kinetic parameters were analyzed using computer program Enzfitters (Sigma).

2) Na의 濃度變化에 따른 效果

三和散이 Na에 의한 Na-K-ATPase活性에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 K 濃度를 10mM로 一定하게 維持하고 Na 濃度를 5mM에서 100mM까지 變化시켜 觀察하였다.

溶液內의 Na 濃度가 增加함에 따라 酵素活性이 점차 增加하여 50mM 濃度에서 最大活性을 보였으며 Na 濃度를 100mM까지 增加시켜도 酵素活性이 더욱 增加하지 않음으로써 飽和現像을 나타내었다.

이들 成績을 分析한 結果 Km값에는 유의한 變化 없이 酵素活性의 最大速度(Vmax)가 0.1% 濃度의 藥物이 存在할 때 12.20에서 6.03 μ mole Pi/mg protein/hr로 유의하게 減少하여 非競爭的 抑制樣相을 보였다.(Fig. 5)

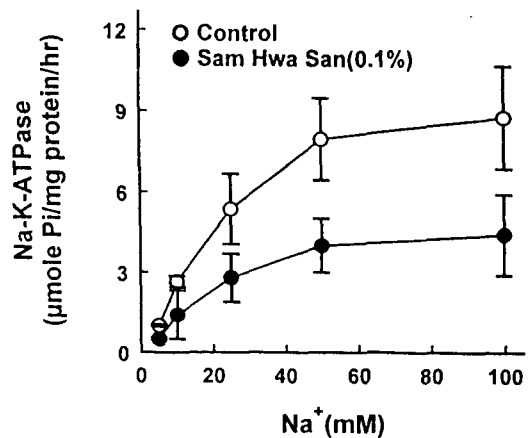


Fig. 5. Effect of Na concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Sam Hwa San(0.1%) in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Data are mean±SE of four experiments.

Kinetic parameters were analyzed using computer program Enzfitters (Sigma).

3) K의 濃度變化에 따른 效果

三和散이 K에 의한 Na-K-ATPase活性에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 Na 濃度를 100mM로 一定하게 固定시키고 K 濃度를 0.2mM에서 10mM까지 變動시켜 관찰하였다.

溶液內의 K 濃度가 增加함에 따라 酵素活性이 점차 增加하여 5mM 濃度에서 最大活性을 보였으며 K 濃度를 10mM까지 더욱 增加시켜도 酵素活性이 더욱 增加하지 않음으로써 飽和 現象을 나타내었다. 이들 成績을 分析한 결과 Km값에는 유의한 變化없이 酵素活性의 最大速度(Vmax)만이 0.1% 濃度の 藥物이 存在할 때 10.70에서 5.52 μmole Pi/mg protein/hr로 유의하게 減少하여 非競爭的 抑制樣相을 보였다.(

Fig. 6)

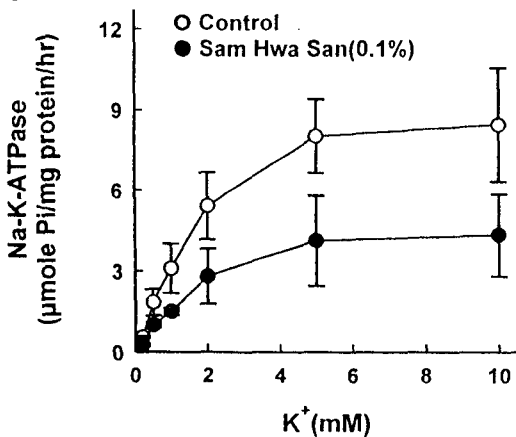


Fig. 6. Effect of K concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Sam Hwa San(0.1%) in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Data are mean±SE of four experiments.

Kinetic parameters were analyzed using computer program Enzfitters (Sigma).

5. 三和散에 의한 酵素活性 抑制效果에 對한 dithiothreitol(DTT)의 影響

Sulfhydryl group은 Na-K-ATPase活性에 대 단히 중요한 基로 알려져 있기 때문에¹⁵⁾, 어떤 藥物이 sulfhydryl group과 결합하여 이 基의 기능을 抑制하거나 그 數를 減少시키게 되면 酵素의 活性이 抑制하게 될 것이다.

따라서 本 實驗에서는 三和散이 sulfhydryl group과 反應하여 酵素의 活性을 抑制하는 지를 確認하기 위하여 sulfhydryl group의 保護藥物인 DTT를 溶液內에 添加한 狀態에서 三和散의 效果를 試驗하였다.

2mM DTT를 處理한 結果 三和散에 의한 酵素活性의 抑制가 유의하게 減少되었다.(Table 1)

Table I. Effect of inhibition of Na-K-ATPase activity induced by SamHwa San in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

		Na-K-ATPase Activity Inhibition(%) (μmole Pi/mg prot/hr)	
-DTT	Control	6.29±1.36	
	+0.1% Sam Hwa San	2.39±0.61	60.80±7.06
+DTT	Control	6.16±0.88	
	+0.1% Sam Hwa San	3.57±0.51	44.77±12.3*

The inhibition of Na-K-ATPase activity by Sam Hwa San was measured in the presence or absence of 2 mM DTT. Data are mean±SE of four experiments. *P< 0.05 compared to the value of -DTT.

DTT, dithiothreitol.

6. 三和散과 ouabain의 相互作用

Ouabain은 다른 ATPase는 抑制하지 않고 Na-K-ATPase 酵素만을 特異하게 抑制하는 藥物로 잘 알려져 있으며¹⁵⁾, ouabain은 Na-K-ATPase의 作用 過程中 中間代謝産物의 磷酸化過程과 脫磷酸化過程을 抑制하는 것으로 밝혀졌다.^{28,29)}

따라서 三和散이 Na-K-ATPase 活性을 抑制할 때 ouabain과 同一한 部位에 作用하는 지를 Woolfolk와 Stadtmann의 方法³⁰⁾으로 觀察하였다.

만약 이들 藥物들이 Na-K-ATPase에 作用할 때 서로 독립적으로 作用한다면 重複抑制(cumulative inhibition) 樣相을 보일 것이고, 서로 다른 作用 기전을 가졌다면 그 抑制程度가 계산된 重複抑制 값보다 낮을 것이다.

즉 三和散(0.1%)과 ouabain(5×10^{-6} M)를 同時에 添加했을 경우 그 抑制가 계산된 값인 69.10%와 유사한 抑制程度가 나타난다면 이들 藥物들은 酵素蛋白質에 서로 獨立적으로 作用한다고 볼 수 있을 것이고, 두 藥物이 同一한 部位에 作用한다면 各各의 藥物에 의한 抑制를 合하면 100%를 넘기 때문에 酵素의 活性이 完全 抑制될 것이다.

실제 觀察된 結果는 이들 두 藥物이 同時에 添加되었을 때 그 抑制程度가 84.51%로 計算

值보다 높게 나타났다.(Table 2)

Table II. Cumulative effect of Sam Hwa San and Ouabain on Na-K-ATPase activity in microsomal fraction of rabbit cerebral cortex

Inhibitor	Na-K-ATPase activity (μ mole P _i /mg prot/hr)	Observed inhibition(%)	Calculated cumulative inhibition(%)
Control	4.48±0.65		
Sam Hwa San (0.1%)	1.70±0.08	59.01±6.47	
Ouabain(5 μ M)	1.06±0.14	75.39±3.73	
Sam Hwa San + Ouabain	0.68±0.12	84.51±1.40	69.10

Cumulative inhibition was calculated as the follows:

$100 - [(100 - 59.01) \times 0.7539]$. Data are mean±SE of four experiments.

IV. 考 察

三和散은 宋代 陳²⁶⁾의 和劑局方에 最初로 收錄되어 五臟不調 三焦不和로 因한 心腹痞悶, 脇肋脹痛, 氣滯 등을 治療한다고 한 後, 대체로 七情으로 因한 氣의 循行障導로 생기는 痛·脹 등의 治療에 使用되어 왔다.^{5,6,16,21,22,24,25)}

處方內容을 살펴보면, 川芎은 血中之氣藥으로 行氣開鬱·活血시키며, 沈香은 降氣調中시키는 作用이 있고, 木香·蘇葉·陳皮는 行氣·理氣하며, 大腹皮·檳榔·白朮은 行氣·利水하고, 羌活은 祛風解表·止痛하며, 木瓜는 舒筋活絡·止痛시키는 作用이 있고, 甘草는 和中定痛하며 諸藥을 調和시키는 效能이 있다.³⁾

이와 같이 構成藥物은 藥性이 모두 溫하고 味는 대부분 辛苦하며 거의 理氣之劑로서 順氣·破滯·和中·止痛 等の 效能을 가지고 있으며^{3,17,19)} 主로 三焦病의 治療에 活用되어 왔다.^{6,16,18,23,25)}

三焦는 各其 그 部位와 機能을 달리하지만 이들 相互間에는 有機的인 연관성이 있어, 上焦의 氣는 中焦에 그 根源이 있고 中焦의 化生作用도 下焦의 協同作用을 통하여 이루어지는 바, 人體의 上中下 三部에 분포되어 三焦의 經絡이 流注하는 通路를 따라 全身의 生命活動을 維持하므로써¹⁾ 生理機能을 調節하며 水液의 運行은 氣의 升降出入에 의하므로 三焦氣化에 의해 水三和散에 對한 實驗 研究로는 玄¹⁵⁾이 利尿 및 腎損傷에 미치는 影響을, 鄭¹³⁾이 腸運動에 미치는 影響을, 李¹¹⁾가 抗Stress效果 및 鎮痛效果에 對하여 報告하였다. 또한 鄭¹⁴⁾은 腎臟의 Na-K-ATPase活性을 억제하여 利尿效果를 나타냄을 報告한 바 있으나, 大腦皮質에 미치는 影響에 對한 研究는 없었다.

最近의 研究에 의하면, 精神機能의 中樞에 該當하는 것이 視床下部로써 視床下部의 反應은 自律神經系, 內分泌系를 通하여 身體機能에 變化를 일으키고 大腦를 通하여 感情表現으로 나타낸다고 생각하여, 認知, 注意, 行動, 感情 等の 精神機能과 化學的 反應과의 關係가 相當히 解明되어지고 있다.⁵⁾

이에 三和散의 行氣·順氣·破滯·止痛 等の 效能이 大腦 및 自律神經系와 密接한 關聯이 있을 것으로 생각되어 大腦의 Na-K-ATPase活性에 어떠한 反應을 나타내는 지를 밝히기 위하여 實驗을 試圖하였다.

實驗에서 三和散은 大腦皮質에서 分離한 Na-K-ATPase活性을 強力하게 抑制하였는데, 抑制程度는 濃度와 處理時間에 比例하였다. 또한 三和散의 構成藥物의 하나인 川芎과 理氣之劑 處方인 莎芎散이 大腦皮質의 Na-K-ATPase活性을 抑制하는 것으로 實驗報告되어¹⁰⁾있어 行氣效能과 Na-K-ATPase活性 抑制의 相關性이 클 것으로 보여진다.

三和散이 어떤 作用機轉을 가지고 있는 지를 糾明하기 위하여 酵素力學的 分析을 하였는데, incubation 溶液內 Na이나 K의 濃度를 變化시켜 觀察한 結果, 最大速度(Vmax)는 藥物 處理에 의해 減少하였으나 藥物과 酵素와의 親和性을 나타내는 Km값에는 影響이 나타나지 않았다. 이는 非競爭的 抑制樣相(noncompetitive inhibition)을 보이는 것이므로 이 藥物이 Na이나 K에 의한 酵素活性部位에 直接 作用하지 않을 것으로 豫想된다. 또한 ATP에 의한 酵素活性의 Vmax가 藥物處理에 의해 減少되고 Km값이 變하지 않음으로써, 藥物이 Na-K-ATPase 酵素에 對한 ATP의 親和性에 變化를 招來하여 抑制作用을 나타내는 것이 아님을 暗示하고 있다.

Sulfhydryl group은 Na-K-ATPase 活性에 대단히 重要的 基로 알려져 있다.⁴¹⁾ 따라서 三和散이 sulfhydryl group과 結合하거나 이 基의 數를 減少시킨다면 酵素의 活性이 抑制될 것이므로, 그 가능성을 試驗하기 위하여 2mM DTT를 incubation 溶液內에 添加한 狀態에서 三和散의 效果를 試驗하였는데, 保護藥物인 DTT 2mM을 處理한 結果 三和散에 의한 酵素活性의 抑制效果가 有意하게 防止되었다. 이러한 結果

는 三和散이 酵素蛋白質에 있는 sulfhydryl group과 反應하여 Na-K-ATPase活性을 抑制할 가능성을 보여주고 있다.

그러나 2mM의 DTT 濃度에서도 三和散의 0.1% 濃度(酵素活性을 約 50% 抑制하는 濃度)에 의한 抑制效果를 完全 防止하지 못함으로써, 三和散의 抑制作用이 sulfhydryl group과 反應에 의해서 만이 나타나는 것이 아님을 가르킨다.

또한 三和散과 ouabain을 同時에 溶液內 添加했을 때 나타나는 抑制程度가 계산된 重複抑制(cumulative inhibition)보다 높아 三和散이 ouabain의 結合部位를 一部分 妨害할 가능성을 보였다. 이는 三和散이 Na-K-ATPase를 抑制하는 作用部位가 ouabain의 結合部位와 一部分 같을 지도 모른다는 것을 意味한다.

三和散이 神經組織에서 Na-K-ATPase活性을 抑制하는 作用이 어떤 機能的 效果와 聯關되는 지는 알 수 없으나 神經末端에서 acetylcholine의 遊離가 Na-K-ATPase 活性의 抑制와 關聯되어 있다는 사실이 알려져 있어⁵⁵⁾ 매우 흥미롭다. 그리고 腸管運動에 對한 三和散의 亢進機能이 副交感神經을 통한 것으로 實驗報告된 바 있는데¹³⁾, Na-K-ATPase活性을 억제하여 acetylcholine을 遊離시켜 腸運動의 亢進作用을 나타낼 가능성이 있는 것으로 생각된다.

中樞神經系에서 acetylcholine은 高度의 精神, 運動 및 感覺, 學習 및 記憶 등의 多樣한 機能을 하고 있으며, Alzheimer病은 acetylcholine系의 機能不全과 關係가 있음이 알려져 있다.²⁾ 또한 末梢副交感神經은 acetylcholine을 遊離하는 神經纖維들로 이루어져 있음은 잘 알려진 사실

이다. 따라서 中樞에서나 末梢에서 acetylcholine의 遊離가 增加된다면 身體機能에 여러가지 變化를 招來할 것이다. 실제로 triflupromazine, chlorpromazine, imipramine과 같은 抗精神性 藥物들이 神經系의 Na-K-ATPase活性을 抑制하며 이들 藥物들이 試驗管內에서 酵素의 活性을 抑制하는 效果와 生體內에서 中樞神經系에 作用하는 效果 사이에 密接한 相關關係가 있음이 밝혀졌다.³²⁾

이와 같이 Na-K-ATPase活性 抑制는 中樞 및 末梢 神經系에서 acetylcholine의 遊離를 增加시키고 여러가지 抗精神性 藥物들이 Na-K-ATPase活性을 抑制함으로써 그 效果를 나타내고 있으나, 三和散이 Na-K-ATPase活性을 抑制함으로써 中樞 및 末梢神經系에 어떤 作用을 나타내는 지는 더욱 追究해 보아야 밝혀질 것으로 생각된다.

V. 結 論

三和散이 神經系內 存在하는 Na-K-ATPase 活性에 어떤 影響을 미치는 지를 確認하고자 家兔·大腦皮質에서 分離한 microsome 分割에서 그 效果를 試驗하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Na-K-ATPase活性은 三和散의 濃度에 比例하여 抑制되었으며, 酵素의 活性을 50% 抑制하는 濃度는 0.12%였다.

2. 三和散의 抑制效果는 酵素蛋白質에 對한

藥物の 處理時間이 延長됨에 따라 增加하였다.

3. Na-K-ATPase는 溶液의 pH 7.5에서 最大 活性을 보였으며 三和散의 處理에 의해 最大 活性을 나타내는 pH는 變하지 않았다. 그러나 그 抑制程度는 中性 pH 範圍에서보다 산성이나 알카리성 pH에서 더욱 增加하였다.

4. 酵素力學的 分析에서 三和散은 ATP, Na 및 K에 의한 酵素活性과는 非競爭的 抑制樣相을 보였다.

5. 三和散에 의한 Na-K-ATPase活性의 抑制 效果는 sulfhydryl group의 保護藥物인 dithiothreitol에 의해 部分的으로 防止되었다.

6. 三和散을 ouabain과 동시에 處理하였을 때 그 抑制程度는 계산된 重複抑制 (cumulative inhibition)보다 높은 값을 나타내었다.

以上の 結果로 三和散은 大腦皮質의 Na-K-ATPase活性을 強力하게 抑制하는 效果를 나타내는데 그 作用部位는 ATP나 Na 및 K의 作用部位와는 다르며, 酵素蛋白質의 sulfhydryl group과 일부분 反應할 뿐만 아니라 ouabain의 結合部位에도 影響을 미쳐 酵素의 活性을 抑制하는 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. 金完熙·崔達永 共編 : 臟腑辨證論治, 成輔社,

p.397-9, 1985.

2. 서유현 : 신경전달물질, 민음社, pp.93-215, 1992.

3. 李尙仁 : 本草學, 서울, 醫樂社, pp.55-9,179-80,p.193,pp.228-9,344-5,367-8,370-1,392-3,398-9,536-7, 1975.

4. 洪元植 編 : 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院, p.24,30,216, pp.246-7, 1981.

5. 黃義完·金知赫 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, p.67,74, 1989.

6. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.89,91,154, pp.194-6, 1976.

7. 金完熙·金廣中 : 三焦에 對한 生理學的 考察, 東洋醫學, 10(1):74-82, 1985.

8. 盧正祐 : 三焦에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院 博士學位 論文, 1976.

9. 裴廷華·洪茂昌 : 三焦의 機能과 病症의 相關性에 對한 研究, 大韓韓醫學會誌,4(2):53-8, 1983.

10. 安日會 外 : 莎芎散이 實驗動物의 止血, 腦壓, 血壓 및 心血管系에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 15(1):80-98, 1994.

11. 李和信 : 三和散의 抗Stress 및 鎮痛에 對한 研究, 大邱韓醫科大學 大學院 碩士學位 論文, 1991.

12. 全燦鎔 : 虛血性心臟에 對한 勝金散의 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院 博士學位 論文, 1994.

13. 鄭智天 : 氣秘에 應用되는 三和散이 腸運動에 미치는 影響, 月刊韓醫學, 1:110-120, 1988.

14. 鄭智天 : 三和散이 家兔 腎臟機能에 미치는

- 影響, 東國大學校 韓醫學 研究所 論文集, 1:55-80, 1992.
15. 玄庸權 : 三和散이 利尿 및 腎損傷에 미치는 影響에 關한 研究, 慶熙韓醫大論文集, 5:325-340, 1982.
16. 康命吉 : 濟衆新篇, 서울, 杏林書院, p.65,92, pp.109-11, 1975.
17. 唐慎微 編 : 重修政和經史證類備用本草, 臺北, 南天書局有限公司, p.148,151,pp.157-8, p.160,pp.174-5,307-8,p.319,332,461,pp.467-8,5 14,1976.
18. 楊士瀛 : 仁齋直指, 臺北, 新文豐出版公司, p.221,243,373, pp.610-1, p.674,1982.
19. 吳 普 : 神農本草經, 北京, 人民衛生出版社, p.18,41,43,103, 1982.
20. 王浴生 外 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.119-26,169-72,264-73,326-9, 567-73,1208-12, 1983.
21. 李 梃 : 編註醫學入門, 서울, 南山堂, pp.1549-50, p.2299, 1985.
22. 林佩琴 : 類證治裁, 臺北, 旋風出版公司, pp.180-3, 1978.
23. 曹孝忠 外 : 聖濟總錄, 臺北, 新文豐出版公司, p.469, pp.810-4, 1978.
24. 周 櫛 : 普濟方, 北京, 人民衛生出版社, p.2031, 1982.
25. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, p.75, pp.283-4, 1971.
26. 陳師文 : 太平惠民和劑局方, 北京, 人民衛生出版社, p.92, 1985.
27. Alber,R.W. : Biochemical aspects of active transport. Ann. Rew. Biochem., 36:727-756,1967.
28. Banerjee,S.P., Dhanna,V.K. and Sen,A.K. : Inhibition of sodium-and-potassium- dependent adenosine triphosphatase: Two modes of action. Mol. Pharmacol., 6:680-689, 1970.
29. Bonting,S.L., Simmon, K.A. and Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase.I-Quantitative in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys., 95:416-425, 1961.
30. Carmichael,F.J. and Israel,Y. : Effects of ethanol on neurotransmitter release by rat brain cortical slices. J.Pharmacol. Exp. Ther., 193:824-834, 1975.
31. Davis,P.W. and Brody, T.M. : Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase-activated adenosine triphosphatase activity in rat brain luy substituted pterothiaginos, Biochem. Pharmacol., 15:703-713, 1966.
32. De Robertis,E., Pellegrino De Iraldi,A., Rodriguez De Lores Arnaiz, G. and Salganicoff,L. : Cholinergic and noncholinergic nerve endings in brain I. J. Neurochem., 9:23-35, 1962.
33. Dunham,E.T. and Glynn, I.M. : Adenosine-triphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol. 156:274-293, 1961.
34. Fiske,C.H. and SubbaRow,Y. : The colorimetric determenation of phosphorus. J Biol. Chem, 66:375-400,1925.

35. Fischer, H.D., Von Schwarzenfeld, I. and Oelsner, W. : Influence of membrane functions on synthesis of acetylcholine increased by cholinomimetic drugs in slices of telencephalon of rats. *Acta Biol. Med. Germ.*, 32:535-543, 1974.
36. Hoffman, P.J. : The link between metabolism and active transport of Na in red cell ghosts. *Fed. Proc.*, 19:127(abst), 1960.
37. Jorgensen, P.L., Hansen, O., Glynn, I.M. and Carieres, J.D. : Antibodies to pig kidney (Na⁺-K⁺)-ATPase inhibit the Na⁺ pump in human red cells provided they have access to the inner surface of the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 291:795-812, 1974.
38. Katz, B. : *Nerve, Muscle, and Synapse*. McGraw-Hill, New York, 1966.
39. Katz, A.I. and Epstein, F.H. : The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biological membranes. *New Eng. J. Med.*, 278:253-361, 1968.
40. Lowry, O.H., Rosebrough, N.D., Farr, A.L. and Randall, R.L. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
41. Patan, W.D.M., Vizi, E.S. and Zar, M.A. : The mechanism of acetylcholine release from nerve parasympathetic nerves. *J. Physiol.*, 215:819-848, 1971.
42. Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. 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.*, 235:1796-1802, 1960.
43. Segel, I.H. : *Enzyme Kinetics*. A Wiley-Interscience Pub. John Wiley & Sons, New York, 1975.
44. Sen, A.K., Tobin, T. and Post, R.L. : A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 244:6596-6603, 1969.
45. Stahl, W.L. and Broderson, S.H. : Localization of Na⁺, K⁺-ATPase in brain. *Fed. Proc.*, 35:1260-1265, 1976.
46. Skou, J.C. : The relationship of the (Na⁺-K⁺) activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membrane. *Bioenergetics*, 4:203-230, 1972.
47. Skou, J.C. : The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, 23:394-401, 1957.
48. Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., and Allen, J.C. : The sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, 27:3-134, 1975.
49. Vizi, E.S. : Does stimulation of Na⁺-K⁺-Mg²⁺-activated ATPase inhibit acetylcholine release from nerve terminals? *Br.*

- J.Pharmacol. Chemother., 48:346-347,1973.
50. Vizi,E.S. : The role of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATPase in transmitter release: acetylcholine release from basal ganglion and its inhibition by dopamine and norepinephrine. In: Subcortical Mechanism and Sensorimotor Activities (ed.Frigtes, T. L.), Hans Huber, Bern, pp.63-89, 1975.
51. Vizi,E.S. : Release mechanism of acetylcholine and the role of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATPase. In: Cholinergic Mechanisms (ed. Waser, P. G), Raven Press, New York, pp.199-211, 1975.
52. Vizi,E.S., Ronai,A., Harsing,L.,Jr. and Knoll,J. : Inhibitory effect of dopamine on acetylcholine release from caudate nucleus. Pol. J. Pharmacol. Pharm.,29:201- 211, 1977.
53. Vizi,E.S. : Termination of transmitter release by stimulation of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - activated ATPase: role of sodium pump in triggering action. J. Physiol., 226:95-117, 1977.
54. Vizi,E.S. : Na^+ , K^+ -ATPase-activated adenosine triphosphatase as trigger in transmitter release. Neuroscience, 3:6367-6384, 1978.
55. Woolfolk,C.A. and Stadtam,E.R. : Cumulative feedback inhibition in the multiple end-product regulation of glutamine synthetase activity in Escherichia Coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 17:313-320, 1964.