

Nucleotides가 세포막 투과도에 미치는 영향

연세대학교 원주의과대학 생리학교실 및 연세대학교 직업의학 연구소

이 중 우 · 정 성 우

(1989년 4월 14일 접수)

= Abstract =

Effects of Various Nucleotides on the Membrane Permeability

Joong Woo Lee and Seong Woo Jeong

*Department of Physiology, Yonsei University, Wonju College of Medicine
and Institute of Occupational Medicine, Yonsei University*

The present study was designed to investigate i) the action of various nucleotides on membrane permeability of rat red blood cell and hepatocyte for Na^+ and Rb^+ ii) the characteristics of purinoceptors on these cell membranes.

Blood from Sprague-Dawley rats was obtained by carotid arterial cannulation. Red blood cells were then washed 3 times with saline at 4°C . Hepatic parenchymal cells were isolated from rat livers by using a modification of the Berry and Friend (1969) method. For the Na^+ influx studies, isolated RBC and hepatocyte were incubated in incubation medium containing $^{22}\text{Na}^+ 0.2 \mu\text{Ci/ml}$ at 37°C . After various time intervals samples were removed from the incubation flask and washed out 3 times with ice-cold washing solutions. Cells were destroyed by adding Triton X-100 and TCA solution. After centrifugation, the supernatants were assayed for $^{22}\text{Na}^+$ by gamma counter. $^{86}\text{Rb}^+$ was used to simulate K^+ in these K^+ efflux studies. Isolated hepatocytes were incubated for 60 min in the loading solution containing $^{86}\text{Rb}^+ 10 \mu\text{Ci/ml}$ at 37°C . After loading, the cells washed out 3 times by centrifugation with washing solution. The cells were incubated in buffer solution at 37°C . At intervals thereafter, samples were removed and centrifuged. The supernatants were analyzed for $^{86}\text{Rb}^+$ by liquid scintillation counter. The main results of the experiments were:

1) ATP and ATPP increased in both $^{22}\text{Na}^+$ influx and $^{86}\text{Rb}^+$ efflux in the red blood cell. Although ADP showed a tendency to increase in RBC membrane permeability for $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$, the changes were not significantly different from the control.

2) The Significant changes in $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ flux by ATP were also demonstrated in hepatocyte. ATPP and ADP showed a tendency to increase in hepatocyte membrane permeability for both ions.

3) Other nucleoside triphosphates—I TP, GTP and CTP—did not change in membrane permeability for $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ in RBC and hepatocyte.

In conclusion, not only ATP but also ATPP activate purinoceptors and change in membrane permeability for Na^+ and K^+ . In order to activate purinoceptors on the cell membrane, the nucleotides have to possess intact adenine moiety and three phosphates or more in its molecule.

Key Words: ATP, nucleotides, $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$ -flux, membrane permeability, red blood cells, hepatocytes

* 이 논문은 1987년도 문교부 학술연구 조성비에 의한 자유공모과제로 선정되어 연구되었음

서 론

ATP(adenosine triphosphate)의 주 작용은 세포 내에서 막을 통한 물질이동, 근육수축 및 물질재합성등과 같은 여러가지 능동적 과정에 필요한 유리 에너지원으로 이용되는 것이다. ATP는 비록 낮은 농도이기는 하나 혈장내에도 존재하여(Forrester & Williams, 1972) 혈관저항 및 조직대사에 영향을 미친다. 즉 ATP를 비롯한 adenine 유도체는 골격근, 피부, 장관 및 심장등에 분포하고 있는 대부분의 혈관계에서 강력한 혈관확장제로 작용한다(Berne, 1963; Dabney et al, 1967; Frohlich, 1963; Kjellmer & Odelram, 1965). 그러나 조직에 따라서는 혈관수축 반응도 나타내어 개의 복재정맥, 대동맥절편 및 제대동맥을 수축시키고(Fiscus & Dyer, 1982; Fuchgott, 1966; Verhaeghe, 1977), 신동맥을 통한 관류 신장 및 간문맥을 통한 관류간 표본에서 관류압을 증가시키는 것으로 보고되었다(Hrdina et al, 1967; Lee & Filkins, 1988). ATP에 의한 수축반응은 방광, 수정관, 위장 및 자궁과 같은 혈관 이외의 평활근에서도 볼 수 있다(Brown et al, 1979; Burnstock, 1978; Burnstock 1981; Cocks & Burnstock, 1979; Daniel & Irwin, 1965). ATP는 세포대사에도 영향을 주어 *in vivo*에서 과혈당증을 유발시키거나 관류간에서 glucose 생산을 증가시키기도 한다(Filkins, 1978; Lee & Filkins, 1987).

이와같은 평활근 수축이나 대사에 미치는 영향은 세포막을 통한 여러가지 ion들의 이동과 연관이 있을 것으로 추측하고 있으며 실제로 몇가지 세포에서 ATP가 ion들의 막 투과도를 증가시킴이 보고된 바 있다. 즉 ATP는 배양세포(3T6 mouse cell), erythro-leukemia cell 및 mast cell에서 K⁺ efflux를 증가시키며(Chawala & Cantley, 1984; Dahlquist et al, 1974; Rozengurt et al, 1977), guinea pig 간 세포에서 막 전위를 hyperpolarization 시킨다(Jager & Schevers, 1980; Jenkinson & Koller, 1977). 또한 ATP는 세포막을 통한 Ca⁺⁺ 이동을 촉진시킨다(Dahlquist, 1974; Kimmich & Randles, 1982).

한편 근자에는 혈관을 비롯한 평활근에 adrenergic이나 cholinergic nervous system 외에도 neuro-

transmitter로 adenosine이나 ATP를 쓰는 purinergic nervous system의 존재가 알려졌으며 일부 평활근 세포막에도 ATP와 같은 purine계 물질이 결합하는 receptor (purinoceptor)가 있는 것으로 보고되고 있다(Chapal & Loubatieres, 1983; Kennedy et al, 1985). 그러나 이 수용체의 성상이나 그 작용기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않으며 이러한 purinoceptor가 모든 세포에 다 존재하는 것인지도 확실치 않다.

따라서 본 연구에서는 purinoceptor의 특성을 규명하는 방법의 일환으로 쥐 적혈구와 간세포를 model로 하여 첫째, ATP가 이들 세포막에서 Na⁺ 및 K⁺ 투과에 미치는 영향을 관찰하여 적혈구 및 간세포에서의 purinoceptor 존재를 확인하고 둘째, ATP외에 그 분자구조가 유사한 nucleotides들의 영향을 비교해 봄으로써 purinoceptor의 특성의 일부를 규명하고자 하였다.

실 험 방 법

1. 실험재료

실험 동물은 체중 200~300 gm 되는 흰쥐(Sprague-Dawley)를 암수 구별없이 사용하였다. 동위원소 ²²NaCl 및 ⁸⁶RbCl은 Amersham 제품(Amersham International Plc, U.K.)을 사용하였고, collagenase (type IV), hyaluronidase, ATPP (adenosine tetraphosphate), ATP (adenosine triphosphate), ADP (adenosine diphosphate), AMP (adenosine monophosphate), adenosine, ITP (inosine triphosphate), GTP (guanosine triphosphate), 및 CTP (cytidine triphosphate)는 Sigma 제품(Sigma Chemical Co. U.S.A.)을 사용하였다. 사용한 nucleotides는 주로 10 mM의 stock을 만들어 1N-NaOH로 pH 7.1~7.3이 되게 적정한 후 영하 20°C의 냉동고에 사용하기 전까지 보관하였다.

2. 적혈구 분리

쥐의 복강내에 Na-thiopental 40 mg/kg를 주사하여 마취하고 경동맥으로부터 혈액을 채취한 다음 이를 clinical centrifuge로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 plasma와 buffy coat를 제거하고

이를 냉각된 세척용액(NaCl 140, KCl 4, HEPES 10, Na-phosphate 1, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 1, glucose 10 mM, pH 7.4)으로 3회 세척하여 Hct 50%의 적혈구 부유액을 만들었다.

3. 간세포 분리

간세포는 변형시킨 Berry 및 Friend (1969) 방법으로 분리하였다. 위와같은 방법으로 쥐를 마취한 다음 개복하여 portal vein에 PE-260 polyethylene tube를 삽입하여 묶은후 바로 흉부를 절개하여 같은 크기의 tube를 thoracic vena cava에 삽입하여 묶었다. 간을 바로 적출하여 liver aeration-perfusion chamber에 옮겨 0.05% collagenase 및 0.1% hyaluronidase가 포함되어 있는 Ca⁺⁺-free Hank씨 용액(NaCl 137, KCl 5.36, Na₂PO₄ 0.34, NaHCO₃ 4.17, MgSO₄ 0.41, MgCl₂ 0.49 mM, pH 7.4)으로 36°C에서 관류하였다. 20~30분간 관류한 다음 간을 perfusate가 들어있는 beaker에 옮겨 횡경막등과 같은 간세포 이외의 조직을 제거하고 잘게 부순다음 100% O₂ 공급하에 37°C에서 10분간 incubation 시켰다. 이를 두겹으로 된 cheese cloth로 여과한 다음 원심분리에 의하여 냉각된 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로 3회 세척하였다. 이렇게 하여 얻은 세포를 0.2% trypan blue에 의하여 viability test (Aw & Jones, 1985)를 하였으며, Bradford(1976) 방법에 의하여 단백질 농도를 정량하였다.

4. ²²Na⁺ Influx 측정

분리한 세포를 적혈구의 경우 Hct이 20~50%, 간세포의 경우 단백질 농도가 4~8 mg/ml 되게 incubation 용액(Na-acetate 95, Na-Phosphate 50, K-acetate 5, ouabain 0.2 mM, pH 7.4)에 넣고 37°C에서 10분간 preincubation한 후 용액내에 ²²Na⁺가 0.2 μCi/ml되게 가하여 60분간 incubation하였다. Incubation한 후 suspension 1 ml를 취하여 이를 clinical centrifuge로 4°C에서 3분간 원심분리하여 그 상등액을 제거하고 냉각된 세척액으로 3회 세척하였다. 세척된 적혈구나 간세포에 1% Triton X-100 0.5 ml와 20% TCA 0.5 ml를 가하여 세포를 파괴하여 원심분리한 후 그 상등액 0.5 ml를 취하여 그 용액에 들어있는 ²²Na⁺의 방사능 활성도를

gamma counter (Packard Auto-Gamma 500)로 측정하였다.

5. ⁸⁶Rb⁺ Efflux 측정

K⁺ 이동은 K⁺ 이동의 index로 이용되는 ⁸⁶Rb⁺를 사용하였다(Putney, 1978). 분리한 적혈구 및 간세포를 ⁸⁶Rb⁺이 10 μCi/ml이 들어있는 loading solution (NaCl 120, KCl 10, Na-phosphate 50 mM, pH 7.4)으로 3회 세척한 다음 incubation 용액에 적혈구는 Hct 6~7%, 간세포는 단백질 농도가 8 mg/ml이 되게 넣고 37°C에서 incubation시켰다. 적당한 시간(0에서부터 120분까지)에 1 ml씩 취하여 4°C에서 3분간 원심분리한 후 그 상등액 0.5 ml를 counting vial에 넣고 liquid scintillation counter (Packard Tri-Carb 300)에서 ⁸⁶Rb⁺ 방사능 활성도를 측정하였다. 이때 incubation 용액에 ATP를 비롯한 여러가지 nucleotides를 0.5 mM되게 첨가하여 이들 nucleotides가 ²²Na⁺ 및 ⁸⁶Rb⁺ 이동에 미치는 영향을 비교하였다.

용액내의 Na⁺ 및 K⁺의 농도는 flame photometer (Radiometer FLM3)로 측정하였다. 결과는 평균 값±표준오차로 나타냈으며 통계학적인 유의성은 Student t-test에 의한 p값이 0.05이하에서 구했다.

실 험 성 적

1. 적혈구 막을 통한 ²²Na⁺ influx 및 ⁸⁶Rb⁺ efflux

분리한 적혈구를 ²²Na⁺가 들어있는 용액에 incubation할 때 매시간 별로 적혈구내로 이동하는 ²²Na⁺양을 제1-A도에 도시하였다. ²²Na⁺ 이동량(influx)은 incubation 시간에 따라 증가하였으며 incubation 시간 90분까지는 거의 직선적으로 증가하였고 그 이후 부터는 증가속도가 차츰 줄어들었다. 본 그림에는 나타내지 않았으나 incubation 시간 180분에는 ²²Na⁺ 유입이 더이상 증가하지 않고 포화현상을 보였다. 같은 실험에서 incubation 용액에 0.5 mM의 ATP가 들어있을 때는 ²²Na⁺ 이동이 같은 시간의 대조군에 비하여 증가됨을 보여준다. 한편 incubation 용액내의 Na⁺ 농도가 증가할수록 적혈구 막을 통한 Na⁺ influx는 증가하였다. 즉 Na⁺

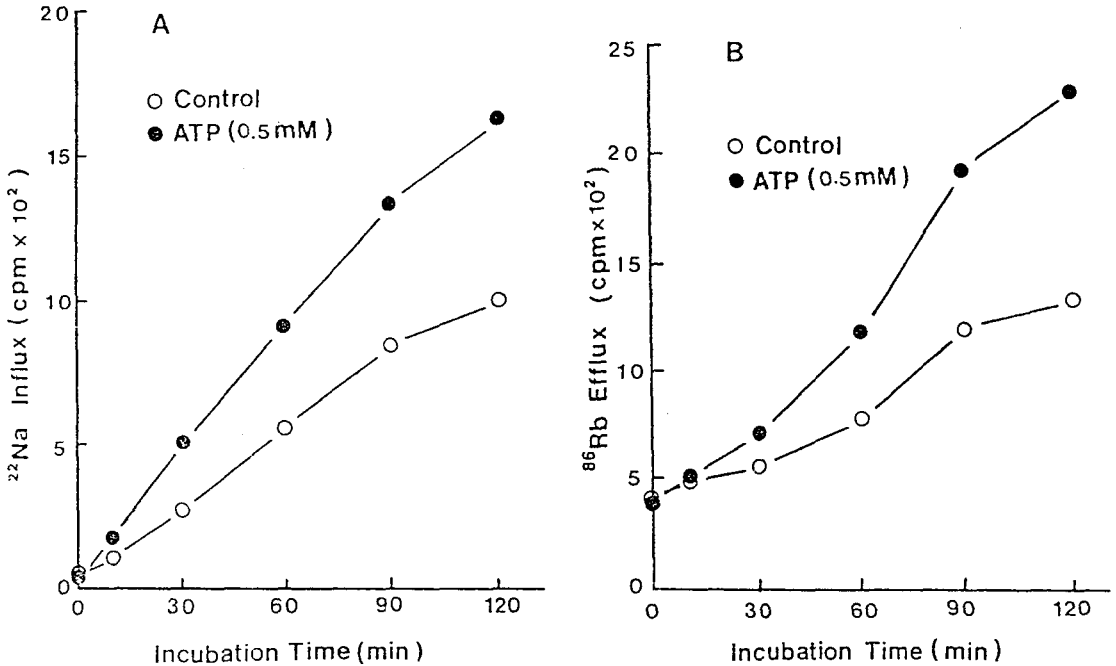


Fig. 1. Time courses of $^{22}\text{Na}^+$ influx into red blood cells (A) and $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from red blood cells (B) in the absence and presence of 0.5 mM ATP.

농도가 1, 50, 100 및 145 mM 일때의 Na^+ influx ($\mu\text{moles}/10^6 \text{ RBC}/\text{hr}$)는 각각 0.009 ± 0.002 , 0.33 ± 0.045 , 0.56 ± 0.052 및 0.74 ± 0.021 로서 적혈구 외액의 Na^+ 농도와 거의 직선적으로 비례함을 알 수 있다.

제 1-B 도는 적혈구에 $^{86}\text{Rb}^+$ 를 loading 시킨 후 incubation 할 때 적혈구로부터 용액내로 빠져 나오는 $^{86}\text{Rb}^+$ 이동 time course를 나타낸 것이다. $^{86}\text{Rb}^+$ efflux도 incubation 시간에 따라 증가하였으며 0.5 mM ATP가 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 증가시킴을 알 수 있다. Incubation 시간 0분에서도 상당량의 $^{86}\text{Rb}^+$ 이 검출되었는데 이는 $^{86}\text{Rb}^+$ loading 후 세척과정에서 적혈구 막 표면에 붙어있던 $^{86}\text{Rb}^+$ 가 유리된 것으로 생각된다. 적혈구 막을 통한 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux는 ATP 농도에 따라 증가하였는데, ATP 0.1 mM에서부터 효과가 나타나기 시작하여 0.5 mM에서 그 최고치를 보였다. 따라서 본 실험에서 incubation 용액에 대한 nucleotides의 농도는 0.5 mM로 하였다.

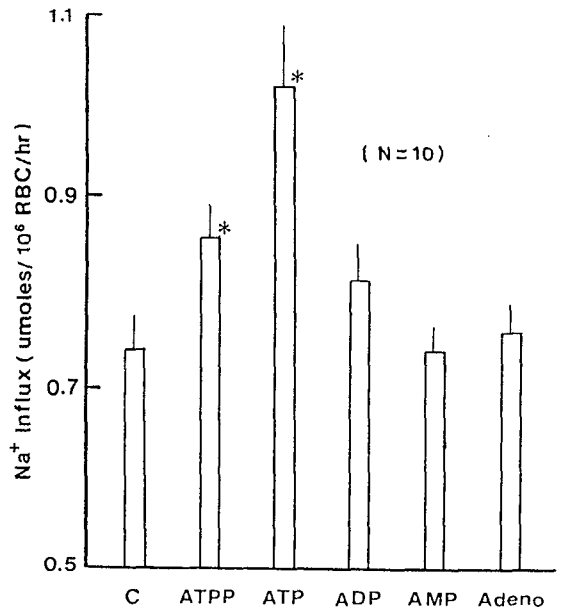


Fig. 2. Effects of various adenine nucleotides and adenosine on $^{22}\text{Na}^+$ influx into red blood cells. Number of experiments is indicated in parentheses. *denote $p < 0.05$ compared to control. Adeno: adenosine.

Table 1. Effects of other nucleoside triphosphates on ²²Na⁺ influx and ⁸⁶Rb⁺ efflux in RBC

Nucleotides	²² Na ⁺ Influx (μ moles/10 ⁶ RBC/hr)	⁸⁶ Rb ⁺ Efflux (cpm/10 ⁶ RBC/hr)
Control	0.74±0.020	4,161±176.3
ATP	1.00±0.060*	5,193±275.2*
ITP	0.73±0.084	4,199±109.1
GTP	0.73±0.018	4,236±162.1
CTP	0.74±0.028	4,150±175.3

Values are mean±SE for 8 separate experiments. * denotes p<0.05 compared to control.

2. 여러 가지 Adenine nucleotides가 ²²Na⁺ influx에 미치는 영향

제2도는 적혈구 막을 통한 Na⁺ influx에 미치는 몇가지 adenine nucleotides의 영향을 incubation 시간 60분에서의 값으로 비교한 것이다. 여러가지 adenine nucleotides들 중에서 ATP 및 ATPP는 Na⁺의 이동을 유의있게 증가시켰으며 (P<0.05) ATP의 효과가 ATPP의 것보다 더 컸다. ADP는 증가시키는 경향은 있었으나 통계학적으로 유의있는 차이는 아니었다 (p<0.01). AMP 및 adenosine은 Na⁺ 이동에 영향을 주지 않았다.

Adenine nucleotides 이외의 다른 nucleoside triphosphate가 적혈구막을 통한 Na⁺ 이동에 미치는 영향을 제1표에 나타냈는데, ATP를 제외한 ITP, GTP 및 CTP는 Na⁺ 이동에 영향을 주지 않았다.

3. 적혈구 막을 통한 ⁸⁶Rb⁺ efflux에 미치는 여러 가지 nucleotides의 영향

여러가지 adenine nucleotides가 적혈구 막을 통한 ⁸⁶Rb⁺ efflux에 미치는 영향을 incubation 시간 90분에서의 값으로 제3도에 비교하였다. Incubation 시간 90분 후에는 적혈구내로 들어갔던 ⁸⁶Rb⁺의 약 17.6%가 유리 되었다. 그림에서와 같이 adenine nucleotides중 ATP 및 ATPP는 ⁸⁶Rb⁺ efflux를 유의있게 증가시켰으며 (o<0.05) ADP는 경향만 나타냈고 AMP 및 adenosine은 ⁸⁶Rb⁺ 이동에 영향을 주지 않았다.

Table 2. Effects of various nucleotides and adenosine on ²²Na⁺ influx and ⁸⁶Rb⁺ efflux in hepatocyte

Nucleotides	Na ⁺ Influx (μ moles/mg cell protein/hr)	⁸⁶ Rb ⁺ Efflux (cpm/mg cell protein/hr)
Control	0.38±0.020	1,034.5±104.2
ATPP	0.60±0.054*	1,315.6±101.2
ATP	0.54±0.040*	1,468.5±110.4*
ADP	0.44±0.033	1,219.5±94.2
AMP	0.41±0.017	1,182.3±91.8
Adenosine	0.39±0.027	1,196.2±104.6
ITP	0.38±0.027	1,126.9±90.2
GTP	0.44±0.035	1,114.8±96.6
CTP	0.46±0.040	1,136.5±110.0

Mean±SE for 8 separate experiments of ion fluxes for control and nucleotide addition are presented. *denotes p<0.05 compared to control.

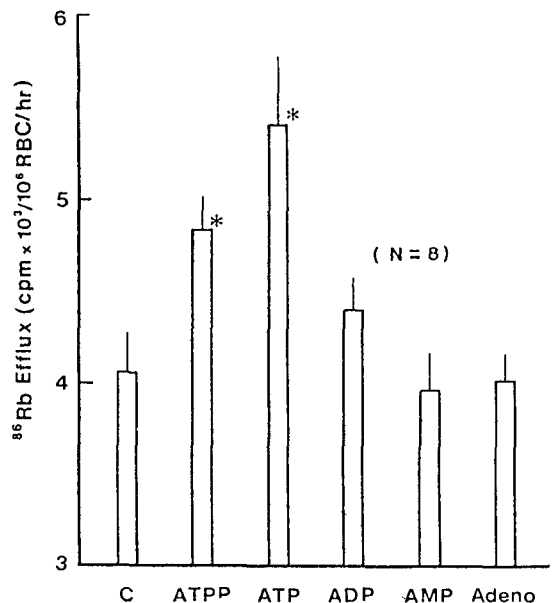


Fig. 3. Effects of various adenine nucleotides and adenosine on ⁸⁶Rb⁺ efflux from red blood cells. Number of experiments is indicated in parentheses. *denotes p<0.05 compared to control. Adeno: adenosine.

$^{86}\text{Rb}^+$ efflux에 미치는 다른 nucleoside triphosphate의 영향을 제1표에 나타냈는데 ATP를 제외한 ITP, GTP 및 CTP는 Rb^+ 이동에 영향을 주지 않았다.

4. 여러가지 Nucleotides가 간세포막을 통한 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux에 미치는 영향

적혈구에서와 같은 방법으로 Na^+ influx 및 efflux에 미치는 여러가지 nucleotides 및 adenosine의 영향을 분리한 간세포에서 관찰하여 제2표에 나타냈다. 간세포내로의 Na^+ influx rate ($\mu\text{moles/mg cell protein/hr}$)는 ATP 및 GTP에 의하여 유의있게 증가하였는데 대조군에 비하여 각각 58% 및 42% 증가하였다. ADP 및 GMP도 Na^+ 이동을 증가시키는 경향은 있었으나 통계학적으로 의의가 없었으며 그 외의 nucleotides나 adenosine은 Na^+ 이동에 영향을 주지 않았다.

한편 Rb^+ efflux ($\text{cpm/mg cell protein/hr}$)의 경우 ATP만 유의있게 증가시켰고 ATP를 비롯한 다른 nucleotides들은 증가 경향만 나타냈다.

고 찰

일반적으로 세포내에는 1~5 mM 정도의 ATP가 존재하면서 세포내에서 일어나는 여러가지 능동적 과정의 에너지 원으로 작용한다. 비록 낮은 농도이거나 하나 세포외액에도 ATP가 존재하여 동맥혈 및 정맥혈 농도가 각각 $0.34 \mu\text{M}$ 및 $1.2 \mu\text{M}$ 정도이고 그 농도는 운동하고 있는 동안 증가하는 것으로 보고 되었다(Forrester & Williams, 1972).

이러한 ATP의 근원은 초기에는 근육세포와 같은 일반세포막을 통하여 빠져 나온 것으로만 생각되어 왔으나 purinergic nervous system이 발견된 지금은 혈중내의 상당량의 ATP가 purinergic nerve ending으로부터 유리된 것으로 생각하고 있다.

오래전부터 ATP를 비롯한 adenine nucleotides가 관상동맥을 비롯한 대부분의 혈관계에서 혈관확장제로 작용한다는 것이 알려져 왔으나(Berne, 1963; Folkow, 1952; Frohlich, 1963), portal vein 등 일부 혈관계에서는 혈관수축을 나타내기도 한다(Fis-

cus & Dyer, 1982; Furchgott, 1966; Lee & Fikins, 1988; Verhaeghe, 1977) ATP는 평활근 수축외에도 쥐간에서 glucose 생산을 증가시키며, 쥐 mast cell에서 histamine 유리를 촉진하고 쥐간 세포막이나 태반 세포막에서 insulin binding을 억제하는 등 여러 가지 반응에 관계하는 것으로 알려졌다(Dahlquist et al, 1974; Lee & Fikins, 1987; Trischitta et al, 1984).

Burnstock 및 그의 공동 연구자들은 혈관을 비롯한 평활근 세포막에 두가지 종류의 purinergic receptor (purinoceptor)가 있을 것으로 추측하였다. 즉 adenosine에 의하여 활성화되며 methylxanthines에 의하여 그 활성이 차단되는 P_1 -receptor와 ATP에 민감하며 apamine, quinidine 및 imidazoline 등에 의하여 차단되는 P_2 -receptor가 있는 것으로 보고되었다(Burnstock, 1978).

ATP가 어떻게 이상과 같은 반응을 나타내게 하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 아마도 ATP가 purinoceptor에 binding 된 후 나타나는 세포막을 통한 ion들의 이동에 기인한 것으로 추측하고 있다. 실제로 ATP는 여러가지 세포에서 ion들의 이동에 관여한다. 즉 ATP는 쥐 mast cell, erythro-leukemia cell 및 소장 epithelial cell에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx를 증가시키며, 생쥐 3T6 cell, mast cell 등에서 K^+ 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 증가시킬 뿐만 아니라, guinea pig 간 세포를 hyperpolarization 시키기도 한다(Chahwala & Cantley, 1984; Dahlquist, 1974; Jager & Schevers, 1980; Kimmich & Randles, 1982; Rozengurt et al, 1977). 본 실험에서도 ATP는 분리한 쥐 적혈구 및 간세포에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 증가시켰다.

ATP가 어떤 기전으로 Na^+ 및 K^+ 이동을 증가시키는지에 대해서는 확실치 않으나 아마도 세포내의 Ca^{++} 농도변화가 이에 관여하는 것으로 생각된다. 왜냐하면 ATP는 쥐 mast cell 및 소장 epithelial cell 등에서 Ca^{++} uptake를 증가시키며, incubation 용액내의 Ca^{++} 농도를 낮추거나 Ca^{++} 이동을 억제하면 ATP에 의한 Na^+ influx 및 K^+ efflux가 억제될 뿐만 아니라 ionophore A23187 등으로 Ca^{++} influx를 증가시키면 이들 ion들의 이동이 촉진되기 때문이다(Burgess et al, 1979; Chahwala & Cantley, 1984).

Dahlquist et al, 1974).

본 실험에서 Na^+ Rb^+ 의 passive permeability가 ATP 외에도 ATPP에 의해서도 증가되었는데 이러한 사실은 이들 세포막에 있는 receptor가 ATP 외의 다른 adenine nucleotides에 의해서도 활성화됨을 말해준다. 그러나 ITP, GTP 및 CTP와 같은 adenine 기의 구조가 변형된 것이라든가 adenine 대신 pyrimidine으로 되어 있는 nucleoside triphosphate에 대해서는 반응하지 않으므로써 Na^+ 및 K^+ 의 투과도가 adenine nucleotides에 대해서만 specific함을 알 수 있다. 뿐만 아니라 Na^+ 및 K^+ 막투과도에 관련하는 purinoceptor가 활성화 되기 위해서는 nucleotide의 adenine moiety가 완전해야 하며 nucleotide의 분자에 적어도 3개 이상의 phosphate기가 붙어 있어야 하는 것으로 추측된다. 위의 결과는 mast cell이나 배양된 3T6 mouse cell에서 Na^+ , Rb^+ 및 Ca^{++} 이동이 ATP에 의해서는 증가되나 ITP, GTP, CTP 및 UTP 등과 같은 다른 nucleotides들에 의해서는 영향을 받지 않는다는 몇가지 보고와 일치한다(Dahlquist, 1974; Rozengurt et al, 1977). 그러나 관류간압 및 portal vein 평활근 수축에 미치는 여러가지 nucleotides 비교실험에서 adenine nucleotides뿐만 아니라 ITP, GTP 및 CTP도 영향을 주는 것으로 보고되었는데(이동 1987; 이 및 정, 1988), 이와 같은 사실은 조직마다 다른 종류의 purinoceptor를 가지고 있거나 같은 receptor라 하더라도 반응정도가 다를 수 있음을 말해준다고 하겠다.

그러면 ATP를 비롯한 adenine nucleotides가 어떻게 적혈구나 간세포에서 Na^+ 혹은 K^+ 투과도를 증가시키는가? 자세한 기전은 밝혀지지 않았지만 아마도 세포막에 있는 G Protein이 관여하는 것으로 추측하고 있다. 몇가지 보고에 의하면 purinoceptor에 nucleotides가 결합하면 여러가지 세포에서의 catecholamine 작용양상과 마찬가지로 세포막에 있는 G protein에 의하여 adenylate cyclase system이 활성화 되거나 혹은 다른 route를 통하여 여러가지 ion channel들이 열림으로써 ion들에 대한 투과도가 증가하는 것으로 추측하고 있다(Fredholm & Dunwiddie, 1988. Gordon, 1986; Katsuragi & Furukawa, 1985; Stiles, 1986). 그러나 정확한 기전은 이에 대한 더 많은 연구가 이루어져야만 밝혀질 것으로 생

각한다.

결 론

여러가지 nucleotides가 쥐의 적혈구 및 간세포에서 $^{22}\text{Na}^+$ 및 $^{86}\text{Rb}^+$ 이동에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) ATP 및 ATPP는 적혈구에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 유의있게 증가시켰다. ADP는 Na^+ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 증가시키는 경향만 나타냈으며 AMP 및 adenosine은 영향이 없었다.

2) ITP, GTP 및 CTP는 적혈구에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux에 영향을 주지 않았다.

3) ATP는 쥐 간세포에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx 및 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux를 유의있게 증가시켰다.

4) ATPP는 간세포에서 $^{22}\text{Na}^+$ influx는 유의있게 증가시켰으나 $^{86}\text{Rb}^+$ efflux는 증가시키는 경향만 나타냈고 그 외의 adenine nucleotides 및 adenosine은 영향이 없었다.

5) ITP, GTP 및 CTP는 간세포에서 $^{22}\text{Na}^+$ 및 $^{86}\text{Rb}^+$ 이동에 영향을 주지 않았다.

이상의 성적으로 미루어 보아 쥐 적혈구 및 간세포에서는 ATPP 및 ATP와 같은 adenine nucleotides에 의하여 활성화 되는 purinoceptor가 존재하며, 이 receptor가 활성화 될때 세포막 투과도가 증가하여 Na^+ influx 및 K^+ eflux가 증가하는 것으로 사료된다. 그리고 이 purinoceptor가 활성화되기 위해서는 nucleotide의 adenine moiety가 완전해야 하며 nucleotide 분자에 적어도 3개 이상의 phosphate가 붙어 있어야 되는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Armando HM, Ellory JC, Ferreira HG, Fleminger S and Lew VL (1975). Inhibition of the calcium-induced increase in the potassium permeability of human red blood cells by quinine. *J Physiol* 250, 32-339
- Aw TY & Jones DP (1985). ATP concentration gradients in cytosol of liver cells during hypoxia. *Am J Physiol* 249, C385-C392
- Berne RM (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J*

- Physiol* 240, 317-322
- Berry MM, And Friend DS (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43, 506-520
- Braford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brown C, Burnstock G & Cocks T (1979). Effects of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and β - γ -methylene ATP on the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* 65, 97-102
- Burgess GM, Clared M & Jenkinson HH (1979). Effects of catecholamines, ATP and ionophore A23187 on potassium and calcium movement in isolated hepatocytes. *Nature* 279, 544-546
- Burnstock G (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell membrane receptors for drugs and hormones: *A multidisciplinary approach*, edited by Bolis L and Straub RW Raven. New York, pp 107-118
- Burnstock G (1981). Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol* 313, 1-35
- Chahwala SB, Cantley LC (1984). Extracellular ATP induced ion fluxes and inhibits growth of friend erythroleukemia cells. *J Boil Chem* 259, 13717-13722
- Chapal J & Loubatieres MM (1983). Evidence for purinergic receptors on vascular smooth muscle in rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 87, 423-430
- Cocks T & Burnstock G (1979). Effects of neuronal polypeptides on intestinal smooth muscle: A comparison with noncholinergic nerve stimulation and ATP. *Eur J Pharmacol* 54, 251-259
- Dabney JM, Scott JB & Chou CC (1967). Action of adenosine and ATP on ideal wall tension and blood flow. *Physiologist* 10, 150
- Dahlquist R (1974). Relationship of uptake of sodium and Ca to ATP induced histamine release from rat mast cells. *Acta Pharmacol Toxicol* 35, 11-22
- Dahlquist R, Diamant B and Kruger PG (1974). Increased permeability of the rat mast cell membrane to sodium and potassium caused by extracellular ATP and its relationship to histamine release. *Int Arch Allergy* 46, 655-675
- Daniel EE, Irwin J (1965). On the mechanism whereby certain nucleotides produce contractions of smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 43, 89-109
- Filkins JP (1978). Effects of exogenous ATP on glucoregulation *in vivo*. *Proc Soc Expt Biol Med* 158, 554-556
- Fiscus RR, Dyer DC (1982). Effects of indomethacin on contractility of isolated human umbilical artery. *Pharmacology* 24, 328-336
- Folkow B (1952). A critical study of some methods used in investigations on the blood circulation. *Acta Physiol Scand* 27, 118-129
- Forrester T & Williams CA (1972). Release of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J Physiol* 224, 611-628
- Fredholm BB & Dunwiddie, TV (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *TIPS April* 130-134
- Frohlich ED (1963). Local effect of adenosine mono-, di-, and triphosphate on vessel resistance. *Am J Physiol* 204, 28-30
- Furchgott RF (1966). Metabolic factors that influence contractility of vascular smooth muscle. *Bull NY Acad Med* 42, 996-1006
- Gordon JL (1986). Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319
- Hrdina P, Bonaccorsi A & Garattini S (1967). Pharmacological studies on isolated and perfused rat renal arteries. *Eur J Pharmacol* 1, 99-108
- Jager LP and Schevers JAM (1980). A comparison of effects evoked in guinea-pig taenia caecum by purine nucleotides and by purinergic nerve stimulation. *J Physiol* 229, 75-83
- Jenkinson DH and Koller K (1977). Interactions between the effects of α - and β -adrenoceptor agonists and adenine nucleotides on the membrane potential of cells in guinea-pig liver slices. *Br J pharmac* 59, 163-175
- Katsuragi T & Furukawa T (1985). Novel, selective purinoceptor antagonists: Investigation of ATP as a neurotransmitter. *TIPS August*, 337-339
- Kennedy C, Delbro D & Burnstock G (1985). P1-Purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat

- femoral artery. *Eur J Pharmacol* 107, 161-168
- Kimmich GA & Randles J (1982). An ATP-and Ca^{++} -regulated Na channel in isolated intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 243, C116-123
- Kjellmer I & Odelram A (1965). The effect of some Physiological vasodilators on the vascular bed of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 3, 94-102
- Lee JW & Filkins JP (1987). Exogenous ATP and carbohydrate metabolism in the rat liver. *Circulatory Shock* 22, 205-219
- Lee JW & Filkins JP (1988). Exogenous ATP and hepatic hemodynamics in the perfused rat liver. *Circulatory Shock* 24, 99-110
- 이중우, 정성우, 이중우 (1987). 수종의 Nucleotides가 간문맥 평활근 수축에 미치는 영향. 연세의대논문집 20(2), 401-415
- 이중우, 정성우 (1988). 수종의 Nucleotides가 취 Portal vein 관류압에 미치는 영향. 원주의대논문집 1(1), 45-51
- Putney JW Jr (1978). Role of calcium in the fade of the potassium release response in the rat parotid gland. *J Physiol* 281, 338-394
- Reed PW (1973). Calcium-dependent potassium efflux from rat erythrocytes incubated with antibiotic A23187. *Fed Proc* 32, 635
- Rozengurt E, Heppel LA & Friedberg I (1977). Effects of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *J Biol Chem* 252, 4548-4590
- Stiles GL (1986). Adenosine receptors: structure, function and regulation. *TIPS December*, 486-490
- Trishitta V, Vigneri R, Roth RP and Goldfine, ID (1984). ATP and other nucleoside triphosphate inhibit the binding of insulin to its receptor. *Metabolism* 33, 577-581
- Verhaeghe RH (1977). Action of adenosine and adenine nucleotides on dog's isolated veins. *Am J Physiol* 233, 114-121