

## 초산납이 흰쥐 synaptosome의 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수에 미치는 영향

이 규 석 · 박 순 철<sup>1</sup>

(관동대학교 의과대학 해부학교실, <sup>1</sup>중앙대학교 생명과학부)

(2000년 4월 18일 접수, 2000년 5월 24일 채택)

**적 요** - Synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 일반적인 흡수특성과 이 과정에 납이 미치는 영향을 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰하였다. 흰쥐의 대뇌와 뇌간에서 각각 분리한 synaptosome의 흡수친화력은 대뇌가  $K_m=0.5 \mu M$ , 뇌간이  $K_m=0.1 \mu M$ 로 모두 고친화성 흡수였고 뇌간에서 더 높았다. 또한 이 흡수과정에 sodium과 potassium 이온이 영향을 미치는 것으로 나타났다. Synaptosome이 [<sup>3</sup>H]-serotonin을 흡수하는 과정은 납에 의해 억제되었고 이러한 납의 특성영향은 *in vitro*와 *in vivo*에서 유사한 결과를 보였다.

### 서 론

신경세포체 (nerve cell body)의 기시분절 (initial segment)에서 생성된 활동전위 (action potential)는 축삭돌기(axon)를 따라 전달되어 종말팽대(end bulb)인 접합전달단에 이르러 접합소낭(synaptic vesicle)내에 포함된 신경전달물질(neurotransmitter)이 세포의 유출과정(exocytosis)을 통해 접합간격으로 분비되게 하는데 이 과정에서 접합전달단으로 칼슘이온의 유입이 수반된다. 분비된 신경전달물질은 접합후막(postsynaptic membrane)을 탈분극 시킨 후, 어떤 것은 분해가 되고 어떤 것은 접합전달단으로 능동재흡수되는데 생물학적 아민성인 dopamin, noradrenalin, serotonin 등은 능동재흡수된다. 따라서 이 과정은 친화력이 높은 재흡수과정이며 Na<sup>+</sup>과 역수송으로 이루어진다(Friedman 1981).

Acetylcholine의 경우, 접합후막을 탈분극시킨 후 접합후막의 acetylcholinesterase (AChE)에 의해 choline과 acetate로 분해되며 이중 choline은 운반체를 통해 Na<sup>+</sup>과 역수송과정을 통해 재흡수되어 acetylcholine합성에 재활용된다(Massarelli *et al.* 1974; Suszkiw와 Pilar 1976). 따라서 각 접합전달단이 정상적으로 기능하기 위해서는 분비되었던 신경전달물질이 재흡수과정을 통해서 효과적으로 이용되어야 할 것으로 생각된다. 분비된 신경전달물질의 재흡수는 콜린성 신경전달물질에서 뿐만 아니라 아민성 신경전달물질에서도 유사한 과정을

통하여 재흡수 될 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 콜린성 신경전달물질의 재흡수 메카니즘과 비교하여 아민성 신경전달물질의 재흡수과정을 연구하고 이러한 재흡수과정에서 납이온이 미치는 영향을 관찰하기 위해 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

실험동물로는 20°C 내외의 실험실에서 표준사료와 수돗물을 공급하면서 사육한 체중 250g 내외의 Sprague-Dowley 계통의 수컷 흰쥐를 사용하였다.

본 실험은 저농도의 납에 급성처리되었을 때 나타나는 영향을 관찰하는 것이 목적이므로 흰쥐에 공급한 상업용 사료와 식수인 수돗물을 대상으로 atomic absorption spectrophotometer (AAS)를 이용하여 납의 포함여부를 조사한 결과 식수에서는 검출되지 않았고 사료에 있어 0.1 ppm 정도로 하루 노출량을 계산한 결과 1.5~2.0 µg/day 정도였다. 본실험에서 사용한 납의 투여량은 0.4 mg/kg (체중)였다. 시약으로 Percoll, EDTA, serotonin, Dithiothretol, Triton X-100, Trichloroacetic acid, BSA (bovine serum albumin) 등은 Sigma사 제품, [<sup>3</sup>H]-serotonin은 Amersham Life Science사 제품, AcINT-AXFTM (cocktail solution)은 Packard사 제품을 그외 시약은 시판 중인 고순도 시약을 사용하였다.

## 2. Synaptosome 분리

*In vitro* 실험을 시행하기 위하여 접합전달단 모델로 이용되는 synaptosome을 분리하였다. Synaptosome의 분리는 Harrison *et al.* (1988)과 Dunkley *et al.* (1988)의 방법을 변형하여 사용한 Lee (1995)의 방법을 사용하였다. 흰쥐의 후두부를 강타하여 실신시킨 후 단두희생하여 뇌를 적출한 후 곧바로 차가운 homogenizing buffer (sucrose, 0.32 M; EDTA, 1 mM; Dithiothreitol, 0.25 M, pH 7.4)에 담가 냉각시킨 후 뇌에서 소뇌 (cerebellum)을 제외하고 대뇌 (cerebrum)와 뇌간 (brain stem)을 분리하였다. 분리한 대뇌와 뇌간은 10배 (W/V)의 동일한 homogenizing buffer (sucrose, 0.32 M; EDTA, 1 mM; Dithiothreitol, 0.25 M, pH 7.4)에 넣고 Toflen-glass homogenizer (International Comp.)를 이용하여 상하 7회를 움직여 파쇄액을 만들었다.

이 파쇄액을 약 1,000 g로 10분간 원심분리 (Hanil Co. LTD, supra 21-K)를 실시하고 그 상층액 (S1 분획)을 가지고 Percoll discontinuous gradient centrifugation하였다. Homogenizing sucrose buffer (pH 7.4)에 Percoll을 혼합하여 최종농도가 3%, 10% 및 15%가 되도록 만든 후 이를 원심분리관에 각각 6 ml씩 고농도가 아래로 내려가게 넣은 후 가장 상층부에 S1 분획을 6 ml 정도 넣고 32,500 g로 5분간 (가속시간과 감속시간을 제외함) 원심분리 (Beckman, J2-MC)하여 3% Percoll 농도 이하에서 각 농도사이에 분리된 분획과 15% 이하에서 침강한 분획을 모두 모아 Krebs sol. (sodium bicarbonate, 4.6 mM; magnesium sulfate, 1.2 mM; potassium phosphate monobasic, 1.2 mM; calcium chloride, 1.3 mM; potassium chloride, 4.8 mM; sodium chloride, 119 mM; pargyline, 0.05 mM; pH 7.4)에 현탁한 후 15,000 g로 15분간 원심분리하여 침강한 분획 (P<sub>2</sub> 분획)을 모아 3회 반복하며 세척한 후 Krebs sol.에 3배 (W/V) 희석하여 현탁하였다.

## 3. 초산납의 투여

숫컷 흰쥐 (250 g 내외)에 초산납의 투여는 초산납을 증류수에 녹여 microsyringe를 이용하여 후두골과 제 1 경추골사이를 찢어넣어 경질막위공간 (epidural space)에 25 µg/kg을 투여하였고 대조군은 생리식염수 동일량을 투여하였다. 투여 후 정해진 시간에 따라 단두희생하여 synaptosome을 분리하였다.

## 4. Synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수

Synaptosome으로 [<sup>3</sup>H]-serotonin (specific activity: 17.8 Ci/mole)의 흡수는 Thorne 등 (1991)의 방법을 변

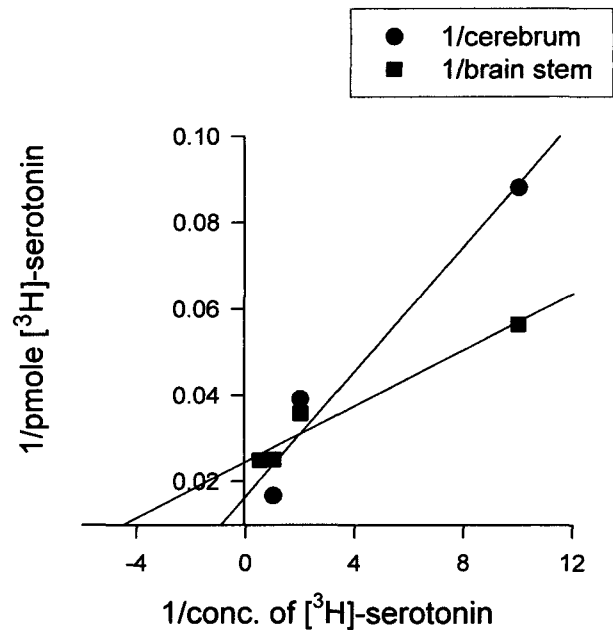


Fig. 1. Double reciprocal plot of [<sup>3</sup>H]-serotonin uptake to synaptosomes. Each value is the means of 4 determinants.

형하여 시행한 Lee (1995)의 방법을 응용하였다. 먼저 Krebs sol.에 [<sup>3</sup>H]-serotonin을 약 0.1 µM (0.1 µCi)가 되게 넣고 37°C에서 약 10분간 방치하여 전처리한 후 P<sub>2</sub> 분획을 50 µl 가하여 20분간 방치하였다. 이때 반응액의 최종부피는 500 µl에 맞추었다. 최종반응 20분이 경과한 후 곧바로 진공펌프를 이용하여 Whatman glass fiber filter paper (GF/F)를 통하여 여과시키고 약 20~25 ml의 차가운 Krebs sol.로 세척한 후 filter paper를 1% Triton X-100이 첨가된 0.1 N HCl 1 ml이 담겨진 scintillation counting vial에 넣고 12시간 이상 [<sup>3</sup>H]를 추출한 후 scintillation cocktail (ScINT-AXFTM)을 넣었다. 그 후 약 36시간 이상이 경과하여 용액과 filter가 투명해진 것을 확인한 후 scintillation beta-counter (Beckman Comp., LS-6500)로 [<sup>3</sup>H]의 양을 측정하였다. 이와 같은 방법으로 첨가하는 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 농도를 0.1 µCi, 반응액에 첨가하는 P<sub>2</sub>분획의 양을 50 µl, [<sup>3</sup>H]-serotonin과 P<sub>2</sub> 분획의 반응시간을 20분으로 결정하였다.

[<sup>3</sup>H]-serotonin의 첨가량과 synaptosome에 의한 흡수량을 계산한 결과 대뇌는 Km=0.5 µM, 뇌간은 Km=0.1 µM로 뇌간에서의 흡수친화력이 높았다 (Fig. 1).

## 5. Synaptosome의 [<sup>3</sup>H]-serotonin 흡수에 미치는 NaCl과 KCl의 영향

Synaptosome이 [<sup>3</sup>H]-serotonin을 흡수하는 과정에서

Na<sup>+</sup> 이온이 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하기 위해 Krebs sol. (sodium bicarbonate, 4.6 mM; magnesium sulfate, 1.2 mM; potassium phosphate monobasic, 1.2 mM; calcium chloride, 1.3 mM; potassium chloride, 4.8 mM; sodium chloride, 119 mM; pargyline, 0.05 mM; pH 7.4)에 NaCl 대신 sucrose를 첨가하여 동일한 삼투압에서 NaCl의 농도변화에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수를 관찰하였다. Krebs sol.의 함유성분 중 NaCl을 119, 100, 80, 50, 20 및 0 mM로 낮추며 대신 sucrose의 농도를 0, 80, 120, 180, 240 및 299 mM로 증가시키면서 반응액을 만든 후 각각의 반응액내에 [<sup>3</sup>H]-serotonin 0.1 M (0.1 Ci)를 첨가하여 10분간 방치한 후(preincubation) synaptosome 50 μl를 가하여 20분간 흡수시킨 다음 Whatmann glass filter paper (GF/F)에 여과시켜 0.7 μm 이상의 synaptosome만을 얻어 흡수한 [<sup>3</sup>H]의 양을 측정하였다. 또한 동일한 방법으로 K<sup>+</sup> 이온과 ouabain의 영향도 관찰하였다.

6. 납(Pb)과 synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수

1) Synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin 흡수에 미치는 납의 영향

납(lead acetate)이 synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 초산납을 0, 0.01 μM, 1 μM, 1 mM의 농도별로 반응액에 첨가한 후 각각의 반응액에 [<sup>3</sup>H]-serotonin 0.1 μM (0.1 μCi)를 첨가하여 10분간 방치한 후 synaptosome 50 μl를 가하여 20분간 흡수시킨 다음 Whatmann glass filter paper (GF/F)에 여과시켜 0.7 μm 이상의 synaptosome만을 얻어 흡수한 [<sup>3</sup>H]의 양을 scintillation beta-counter를 이용하여 측정하였다.

2) 납(Pb)의 생체 투여

납을 초산납 형태로 생체에 투여한 실험군을 대상으로 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수양상을 관찰하기 위해 생체 투여 후 1일, 3일, 6일, 12일이 경과한 후 흰쥐를 단두회생하여 synaptosome을 분리하여 [<sup>3</sup>H]의 양을 측정하였다.

7. 단백질정량

Synaptosome의 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하였으며 표준 시료로는 Sigma사의 bovine serum albumin을 이용하였다. 또한 통계처리는 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과 실험군의 평균값에서의 차이를 비교하였다.

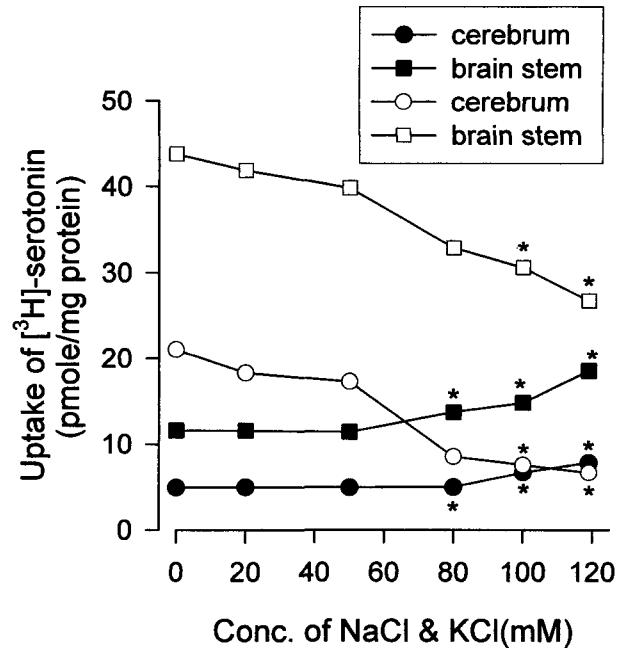


Fig. 2. The uptake of [<sup>3</sup>H]-serotonin to the synaptosomes and the concentrations (mM) of NaCl and KCl. Open symbol: KCl, closed symbol: NaCl. Asterisks show statistically significant difference at p < 0.05 (n=6).

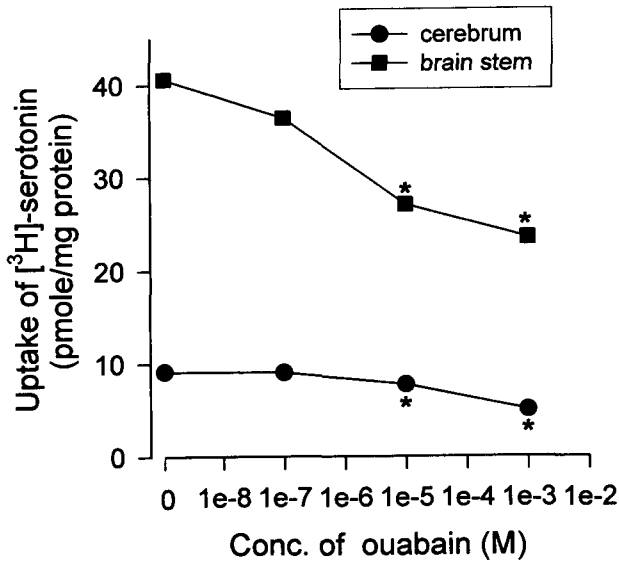
결 과

1. NaCl과 KCl이 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수에 미치는 영향

Synaptosome이 serotonin을 흡수하는 과정에서 Na<sup>+</sup>의 영향을 관찰한 결과 대뇌와 뇌간에서 분리한 synaptosome 모두에서 Na<sup>+</sup>에 의존적이었다.

흡수율은 뇌간에서 대뇌에 비해 높았다. 대뇌의 경우 NaCl 농도 80 mM까지는 4.9 ± 2.1 (pmole/mg protein)로 변화가 거의 없었고 80~119 mM에서 7.8 ± 4.3 (pmole/mg protein)로 증가하였다. 뇌간에서는 80 mM에서 부터 유의한 증가를 보였다. 따라서 뇌간에서의 증가율이 대뇌 보다 높았다(Fig. 2). 이것은 신경전달물질이 carrier에 의해 세포막 안으로 들어오는 과정에서 세포막 외부의 Na<sup>+</sup> 농도가 높으면 보다 원활하게 흡수가 일어난다는 것을 나타낸다.

K<sup>+</sup>는 Na<sup>+</sup>의 경우와 반대의 결과를 나타내었다. 대뇌와 뇌간에서 분리한 synaptosome에서 K<sup>+</sup> 이온이 완충액내에 들어있지 않은 경우가 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수량이 가장 높았으며 K<sup>+</sup> 농도가 증가할수록 두 부위의 synaptosome에서 모두 통계적으로 유의하지는 않았으나 흡수량이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2). K<sup>+</sup>은 Na<sup>+</sup>와



**Fig. 3.** The uptake of  $[^3\text{H}]$ -serotonin to synaptosomes and concentrations of ouabain ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase inhibitor). Asterisks show statistically significant at  $p < 0.05$  ( $n=6$ ).

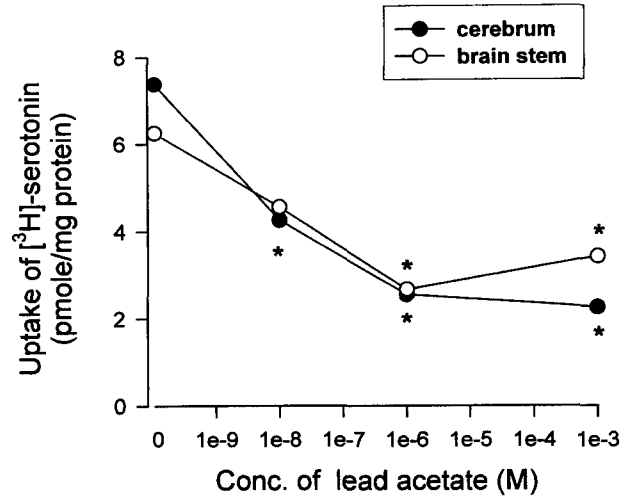
마찬가지로 세포막의 전위차 형성에 관여하며 세포외부의 농도가 증가할수록 세포안과 밖의 전위차는 감소하게 되어 탈분극의 정도도 감소하게 된다. 따라서 synaptosome에 의한  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수가 감소한 것으로 보아 시냅스막외부의  $\text{K}^+$  이 고농도로 있게 되면 일정한 수준의 안정전위형성을 저해하여 탈분극이 감소되었다고 판단되며 따라서 serotonin의 흡수과정이  $\text{K}^+$  이온에 의존적일 가능성이 있음을 암시한다.

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase 활성억제제 (ouabain)가 synaptosome에 의한  $[^3\text{H}]$ -serotonin 흡수과정에 영향을 미치는지를 관찰한 결과 대뇌와 뇌간 모두에서 ouabain의 첨가농도가 증가할수록  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수량은 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 synaptosome에 의한 serotonin의 흡수에  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase도 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

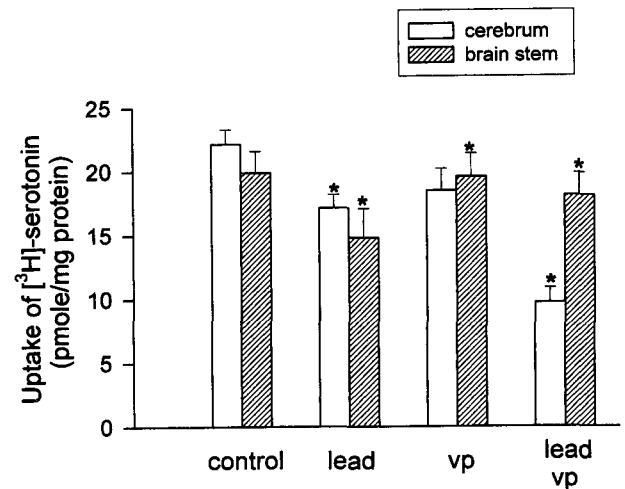
**3. 납과 synaptosome에 의한  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수**

**1) Synaptosome에 의한  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수에 미치는 납의 영향**

Synaptosome에 의한  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수과정에 미치는 납 (Pb)의 영향을 관찰한 결과 대뇌와 뇌간에서 분리한 synaptosome 모두에서 첨가한 납 (lead acetate)의 농도가 증가할수록  $[^3\text{H}]$ -serotonin의 흡수량은 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).



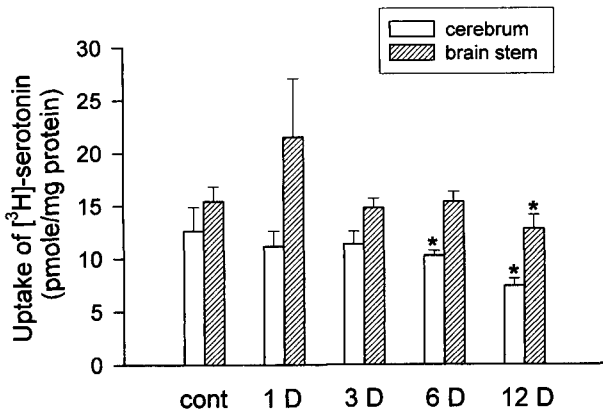
**Fig. 4.** The uptake of  $[^3\text{H}]$ -serotonin to synaptosomes and concentrations of lead acetate. Asterisks show statistically significant at  $p < 0.05$  ( $n=6$ ).



**Fig. 5.** The effect of verapamil on the influx of lead to the inside of the synaptic membrane. The concentration of verapamil was 10 mM. Each value is mean  $\pm$  S.D. cont: control group, vp: verapamil, Asterisks show statistically significant at  $p < 0.05$  ( $n=6$ ).

**2) Synaptosome 내로 납의 유입 경로**

Pb가 세포내로 유입되는 경로로  $\text{Ca}^{++}$ 의 이동경로인 calcium channel을 부분적으로 이용될 것으로 판단되어 incubation buffer에 납과 함께 calcium channel 차단제인 verapamil을 첨가하여 관찰한 결과 대뇌의 synaptosome과 뇌간의 synaptosome에서 다른 양상을 보였다. 대뇌의 경우 납만 처리한 실험군과 verapamil만 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 약간 감소한 반면 납과 verapamil을 동시에 처리한 실험군은 흡수율이 더 감소



**Fig. 6.** The uptake of [<sup>3</sup>H]-serotonin to synaptosomes from cerebrum and brain stem after lead injection in vivo. The dosage of lead was 10 μl of 1% lead acetate. Each value is mean ± S.D. Asterisks show statistically significant at p < 0.05 (n=6).

하여 calcium channel 차단효과가 없음을 보였다. 그러나 뇌줄기에서 분리한 synaptosome의 경우는 다른 양상을 보였다. 납만 처리하거나 verapamil만 처리한 실험군의 흡수율은 대조군에 비해 감소하였다. 그러나 납과 verapamil을 동시에 처리한 실험군의 흡수율은 verapamil만 처리한 실험군 보다는 낮았으나 납만 처리한 실험군보다는 높아 verapamil에 의한 calcium channel 차단효과가 있었다(Fig. 5).

**4. 납(Pb)의 생체 투여**

납을 초산납(lead acetate)형태로 흰쥐에 투여한 후 대뇌와 뇌간에서 분리한 synaptosome에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수율을 관찰한 결과 대뇌에서 분리한 synaptosome의 흡수율은 시간이 경과할수록 감소하는 것으로 나타났고, 뇌간에서 분리한 synaptosome의 경우는 흡수율이 1일이 경과한 후 약간 증가하였다가 이후 뇌간과 마찬가지로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

**고 찰**

일반적으로 amine 계통의 신경전달물질인 serotonin에 대한 synaptosome의 흡수특성은 같은 계열의 dopamine이나 noradrenalin의 흡수 특성과 유사한 점이 많을 것으로 생각된다. noradrenalin의 경우 대뇌와 뇌간에서 각각 분리한 synaptosome에 의한 신경전달물질재흡수과정이 서로 달라 대뇌피질의 synaptosome에 의한 재흡수과정이 뇌간의 synaptosome 보다 Na<sup>+</sup> 의존이라고 하였다(Longan과 Donovan 1980). 또한 이 연구자들

은 Na<sup>+</sup> 의존적인 흡수특성은 시냅스막에 내재해 있는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase의 작용에 의한다고 하였다. serotonin의 흡수특성을 관찰한 본 실험에서 ouabain을 농도별로 투여한 결과 투여농도가 증가할수록 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수량이 감소하는 것으로 보아 serotonin의 흡수특성도 Na<sup>+</sup>에 의존적이었으며 noradrenalin과 유사하였다.

또한 choline계의 신경전달물질의 재흡수과정 역시 Na<sup>+</sup> 의존적이라는 사실이 밝혀져 있어(Massarelli 등 1974; Suszkiw과 Pilar 1976) 이러한 Na<sup>+</sup> 의존성은 serotonin의 흡수과정에도 적용된다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

콜린계의 신경전달물질의 작용이 종결되는 형태는 acetylcholinesterase의 작용에 의해 choline과 acetate로 분해되며 끝나는 반면 세로토닌은 아민계의 신경전달물질로서 시냅스전말단에서 분비되어 시냅스후막을 탈분극시킨 후 분해되지 않고 시냅스전말단으로 재흡수되므로 choline과는 다른 흡수과정을 거치게 된다. 한편 콜린계의 재흡수과정은 서로 다른 특성을 가진 두종류의 콜린 전달계에 의해 이루어진다고 한다(Murrin 1980; Ross 1980). Murrin (1980)에 의하면 두 전달계중 하나는 고친화성전달계이며 이 전달계의 Km 값은 0.5~10 μM이며 또한 이 흡수과정은 Na<sup>+</sup> 의존적이며 주로 아세틸콜린의 재합성과 관련이 있다. 다른 전달계는 저친화성전달계인데 Km 값이 50~200 μM을 보이며 Na<sup>+</sup> 비의존적인 과정으로 아세틸콜린의 재합성과는 관계가 적다고 한다. 세로토닌의 경우는 시냅스후막을 탈분극시킨 후 분해됨이 없이 곧바로 시냅스전말단으로 재흡수되는데 이때 콜린계와 동일한 방법으로 친화력을 알아본 결과 대뇌에서 분리한 synaptosome의 경우는 0.5 μM, 뇌간에서 분리한 synaptosome은 0.1 μM로 뇌간의 경우가 더 친화력이 높게 나타났다. 이것은 serotonergic neuron의 분포가 대뇌에 비해 뇌간에서 더 풍부하다는 것을 암시하며 대뇌와 뇌간 모두에서 serotonin은 고친화적인 흡수양상을 나타내었고 동시에 Na<sup>+</sup> 의존적인 과정이 있었다.

한편 serotonin의 방출은 K<sup>+</sup>에 의한 탈분극에 의해 촉진되며 이 과정은 Ca<sup>++</sup>에 의존적이라고 한다(Mounsey 등 1982). 따라서 K<sup>+</sup>은 serotonin의 방출 뿐 아니라 흡수에도 영향을 미칠 것으로 판단되어 실험해 본 결과 K<sup>+</sup>의 농도가 증가할 수록 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 흡수량은 감소하는 것으로 나타났는데 이것은 첨가하는 K<sup>+</sup>의 농도가 증가할수록 세포막의 전위차는 오히려 감소하여 효과적인 탈분극이 일으키지 못하기 때문으로 판단된다. 따라서 탈분극을 일으키는 시냅스막의 전위차는 K<sup>+</sup> 농도의 log 값에 비례하게 되는데 본 실험에서 관찰한 침

가한  $K^+$  농도의 log 값에 따른  $[^3H]$ -serotonin의 흡수는 막전위차가 감소하는 것에 비례하여 감소함을 확인할 수 있었다. 이와같이  $K^+$  농도변화에 따라서 synaptosome에 의한  $[^3H]$ -serotonin의 흡수에 영향을 미친다는 결과는 현재까지 보고된 바 없는 의의있는 결과라 하겠다. 또한  $Na^+-K^+$  ATPase의 활성억제제인 ouabain의 처리효과는 대뇌와 뇌간의 synaptosome에서 모두 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났고 뇌간에서 더 감소하였다(Fig. 3). 따라서 synaptosome에 의한 serotonin의 흡수는  $Na^+$ 와  $K^+$ 에 의존적이었으며 이 두 이온이  $Na^+-K^+$  ATPase를 매개로 synaptosome막을 통한 효과적인 이동이 serotonin의 방출은 물론 흡수에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

신경전달물질의 방출과 흡수에 납이 영향을 미치는 기전은 우선 시냅스전말단의 막을 중심으로 내부와 외부 사이에 여러 이온들의 전달을 방해하는 것으로 보고되고 있으며(Audeirk 1985; Alkondon 등 1990), 그의 납이 칼슘통로를 통해 세포내부로 유입되어 세포내부의 여러 생리적 변화를 일으킬 가능성도 시사하고 있다(Simons와 Pocock 1987; Simons 1986). 따라서 본 실험에서 incubation buffer에 calcium channel차단제인 verapamil효과와 이때 납의 영향을 비교 관찰한 결과, 대뇌의 synaptosome에 있어서는 대조군의 흡수율은  $22.4 \pm 1.4$ 였고 납만 처리한 군은  $17.2 \pm 1.0$ , verapamil만 처리한 군은  $18.4 \pm 1.7$ 로 나타나 대조군에 비해 모두 감소를 보였고 납과 verapamil만을 처리한 실험군은  $9.7 \pm 1.1$ 의 흡수율을 보여 납의 영향이 적은 것으로 나타났는데 이것은 verapamil에 의해 calcium channel의 차단으로 납이 synaptosome으로 내부로의 유입이 억제되었기 때문으로 판단된다. 그러나 뇌간에서 분리한 synaptosome의 경우는 대뇌의 경우와는 다른 결과를 나타내었다. 뇌간에서 대조군의 흡수율은  $19.8 \pm 1.6$ 였고, 납만을 처리한 실험군은  $14.7 \pm 2.3$ , verapamil만을 처리한 실험군은  $19.5 \pm 1.8$ 의 흡수율을 보여 대조군에 비해 감소하였고 납과 verapamil을 동시에 처리한 군은  $18.1 \pm 1.7$ 의 흡수율을 보여 대조군과 verapamil만을 처리한 실험군보다는 약간 감소하였으나 납만을 처리한 군보다는 흡수율이 높았다. 따라서 verapamil에 의한 칼슘통로 차단으로 인해 이 통로를 통한 납의 내부유입이 일어나지 않았다고 판단된다. 일반적으로 verapamil은 주로 L-형 칼슘통로(voltage-gated calcium channel)를 선택적으로 차단하는 효과가 있으므로 본 실험에서의 결과로 판단해 뇌간의 synaptosome에 L-형 칼슘통로가 대뇌에 비해 훨씬 많이 분포하는 것으로 판단된다.

결론적으로 납은 synaptosome막을 통한  $Na^+$ 과  $K^+$

등의 이온 흐름을 방해하여 독성작용을 나타내며 또한 calcium channel 등을 통해 synaptosome내부로 유입되어 내부의 여러 생리학적 변화를 유발하는 형태로 독성작용을 나타내므로 납은 synaptosome막(세포막)을 중심으로 안과 밖에서 독성작용을 나타내는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 이서은(1995) Effect of Lead (Pb) of choline uptake and acetylcholine release in the synaptosomes from rat Hippocampus. 연세대학교 박사학위논문.
- Alkondon M, ACS Costa, V Radharrishman, RS Aronstam & EX Albuquerque (1990) Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett.* **261**: 124-130.
- Audesirk G (1985) Effects of lead exposure on the physiology of neurons. *prog. neurobiol.* **24**: 199-231.
- Ducis I (1988) The high-affinity choline uptake system. *Handb. Exp. Pharmacol.* **86**: 409-445.
- Dunkley PR, JW Heath, SM Harrison, PE Jarvie, PJ Glenfield & JAP Rostas (1988) A rapid Percoll procedure for isolation of synaptosome directly from an  $S_1$  fraction: homogeneity and morphology of subcellular fraction. *Brain Res.* **441**: 59-71.
- Friedman E, E Meller & M Hallock (1981) Effects of conformationally restrained analogues of serotonin on its uptake and binding in rat brain. *J. Neurochem.* **36**(3): 931-937.
- Goldstein GW, JS Wolinsky & J Csejtey (1977) Isolated brain capillary: a model for study of lead encephalopathy. *Ann. Neurol.* **1**: 235-239.
- Harrison SM, PE Jarvie & PR Dunkley (1988) A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an  $S_1$  fraction: viability of subcellular fraction. *Brain Res.* **441**: 72-80.
- Jope RS (1979) High affinity choline transport and acetyl-CoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain Res.* **1**: 313-344.
- Longan JG & DJ O'Donovan (1980) Noradrenalin uptake by synaptosomes and ( $Na^+-K^+$ ) ATPase. *Biochem. Pharmacol.* **29**: 2105-2112.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr & RJ Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Markovac J & GW Goldstein (1988) Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **96**: 14-23.
- Massarelli R, J Ciesielski-Tereska, A Ebel & P Mandel

- (1974) Choline uptake in glial cell cultures. *Brain Res.* **81**: 361-363.
- Mounsey I, KA Brady, J Carroll, R Fidher & DN Middlemiss (1982) K<sup>+</sup>-evoked [<sup>3</sup>H]-5-HT release from rat frontal cortex slices: the effect of 5-HT agonist and antagonist. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 49-53.
- Murrin LC (1980) High-affinity transport of choline in neuronal tissue. *Pharmacology* **21**: 132-140.
- Piccinini F, L Favalli & MC Chiari (1977) Experimental investigation on the concentration induced by lead in arterial smooth muscle. *Toxicology* **8**: 43-51.
- Pocock G & TJB Simons (1987) Lead enters bovine adrenal medullary cell through calcium channels. *J. Neurochem.* **48**: 383-389.
- Pounds JC, R Wright, D Morrison & DA Casciano (1982) Effect of lead on calcium homeostasis in the isolated rat hepatocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**: 389-401.
- Ross SB (1980) Neuronal transport of 5-hydroxytryptamine. *Pharmacology* **21**: 123-131.
- Silbergeld EK (1992) Mechanism of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. *Faseb. J.* **6**: 3201-3206.
- Simons TJB (1986) The role of anion transport in the passive movement of lead across the human red cell membrane. *J. Physiology* **378**: 287-312.
- Simons TJB & G Pocock (1987) Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels. *J. neurochem.* **48**: 383-389.
- Susziw JB & G Pilar (1976) Selective localization of a high affinity choline uptake system and its role in ACh formation in cholinergic nerve terminal. *J. Neurochem.* **26**: 1133-1138.
- Thorne B, S Wonnacott & PR Dunkley (1991) Isolation of hippocampal synaptosomes on Percoll gradients: cholinergic markers and ligand binding sites. *J. Neurochem.* **56**: 479-484.
- Vaca K & G Pilar (1979) Mechanisms controlling choline transport and acetylcholine synthesis in motor nerve terminals during electrical stimulation. *J. Gen. Physiol.* **73**: 605-628.
- Weiler MH, RS Jope & DJ Jenden (1978) Effects of pre-treatment under various cationic conditions on acetylcholine content and choline transport in rat whole brain synaptosomes. *J. Neurochem.* **31**: 789-796.

## Effects of Lead Acetate on the Uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin by the Synaptosomes Separated from the Cerebrum and Brain Stem of the Rat

Kyu-Seok Lee and Soon-Chul Park<sup>1</sup>

(Department of Anatomy, Kwandong University College of Medicine, Kangnung, Korea

<sup>1</sup>School of Life Science, Choong Ang University, Seoul, Korea)

**Abstract** - This study was carried out to investigate the physiological changes induced acutely with the low doses of lead acetate in the synaptosomes from the cerebrum and brain stem of the rat. The general uptake patterns of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin were observed in synaptosomes, as a model of presynaptic nerve terminal, from the cerebrum and brain stem. And the effects of the low doses of lead acetate on the uptake process were investigated *in vitro* and *in vivo*. The  $K_m$  value of the uptake of the [ $^3\text{H}$ ]-serotonin by the synaptosomes was  $0.5 \mu\text{M}$  in the cerebrum and  $0.1 \mu\text{M}$  in the brain stem. These low values reveal that the synaptosomes from the cerebrum and the brain stem have a high affinity to [ $^3\text{H}$ ]-serotonin, especially in brain stem. The uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin was dependant on the sodium and potassium ions. When being treated with ouabain, the  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPase inhibitor, the uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin was reduced. This supports strongly that the uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin was sensitive to the changes of the concentrations of the sodium and potassium ions. When the calcium channel blocker, verapamil, was treated, the uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin was changed only in synaptosomes from the brain stem. The uptake of [ $^3\text{H}$ ]-serotonin was reduced by the lead treatment in the synaptosomes from the cerebrum and brain stem *in vitro* and *in vivo*. [lead acetate, synaptosomes,  $^3\text{H}$ -serotonin, rat]