

# 흰쥐 적혈구세포막 Adenosine Triphosphatase에 미치는 Diphenylhydantoin의 영향

## The Effects of Diphenylhydantoin on Adenosine Triphosphatase Activity in Rat Erythrocyte Membranes

서울대학교 의과대학 약리학교실  
<지도 오진섭 교수>

### 이 정 윤

#### 목 차

I. 서론	
II. 실험방법 및 재료	
1) 적혈구세포막 ATPase의 제작	
2) ATPase활성도 측정	
3) 시약	
III. 실험성적	
1) 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase활성에 대한 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> 의 영향	
2) 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase활성에 대한 Ouabain의 영향	
3) 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase활성에 대한 Dilantin의 영향	
4) 흰쥐 적혈구세포막 Mg <sup>++</sup> -ATPase에 대한 Dilantin 및 Ouabain의 영향	
5) 흰쥐 적혈구세포막 Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase활성에 대한 Ouabain 및 Dilantin의 영향	
IV. 고찰	
V. 결론	
영문초록	
참고문헌	

### 1. 서론

최근 약물의 수용체로서의 세포막 및 세포하구조물에 대한 관심이 날로 높아져 많은 업적들을 볼 수 있으며 이같은 세포막에 대한 약물의 영향을 추구함에 있어 적혈구세포막은 비교적 손쉽게 순수하게 분리될 수 있으며, 또한 타조적세포에서와 같이 물질 이동에 관련되는 에너지대사기구를 가추었다는 점으로 널리 이용되고 있다. 세포내외의 이온평형은 세포막을 통한 이온이동에 의하여 유지되며 이들 이동은 여러가지 조건 또는 약물

에 의하여 영향을 받는다.

1953년 Schatzman<sup>1)</sup>은 적혈구를 냉각시킬 경우 세포 내 K<sup>+</sup>의 소실을 관찰하고 이 적혈구를 37°C의 포도당 반응액에 넣었을때 Na<sup>+</sup>의 세포외로의 이동과 K<sup>+</sup>의 세포내로의 이동을 관찰하였다. 또 이같은 이온이동은 Strophantin에 의하여 억제됨을 보고하였다.

Post등(1960)<sup>2)</sup>은 사람의 적혈구세포막을 분리하고 이 적혈구세포막내 Adenosine-triphosphatase (ATPase)의 성상을 광범하게 실험하여 적혈구세포막 ATPase도 정상 적혈구에서 일어나는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 이동에 관여함을 관찰하고 ATPase활성도 및 이온이동에는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 존재를 필요로 함을 보고하고 또 ATPase 활성도는 강심배당체인 Ouabain에 의하여 억제됨을 보고하였으며 그의 여러학자들도<sup>3-6)</sup> 적혈구세포막도 신경세포 또는 타조적세포막과 같이 이온이동이 일어나고 있으며 이들 이온이동은 세포막에 의한 Adenosine-triphosphate (ATP)의 분열과 밀접한 관계가 있음을 보고 하였다.

또한 Repke(1965)<sup>7)</sup>는 강심배당체에 의한 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated ATPase (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase)의 선택적인 억제 현상은 강심배당체의 심장에 대한 작용과 밀접한 관계가 있으리라고 시사한바 있다.

Diphenylhydantoin (Dilantin)은 1938년 Merrit 및 Putnam에 의하여 전간의 대증요법제로서 소개되어 현 금까지 주로 대발작치료제로 이용되고 있으며 그 작용 기전을 규명하려는 많은 시도가 있었으나 아직 만족할 만한 해결을 보지못하고 있다<sup>8)</sup>.

한편 최근 Dilantin은 Conn (1965)<sup>9)</sup> 및 Bernstein (1965)<sup>10)</sup>에 의하여 효과적인 부정맥치료효과가 있음이 보고 되었고 Woodbury (1955)<sup>11)</sup>는 Dilantin이 뇌세포, 골격근 및 심근세포내의 Na<sup>+</sup>농도를 저하시킴을 관찰하고 이는 Dilantin이 Na<sup>+</sup>의 세포외로의 대사성이동을 자극 함이 아닌가 시사한바 있으며 중독량의 Digitalis에 의

하여 유발된 심장부정맥 및 심근의 K<sup>+</sup> 소실이 Dilantin에 의하여 회복됨이 Helfant등 (1968)<sup>12)</sup>에 의하여 보고되었다. 저자는 흰쥐 적혈구세포막에 대하여 강심배당체인 Ouabain과 Dilantin이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase의 활성도에 미치는 영향을 관찰코자 본 실험을 시도하였다.

## 2. 실험방법 및 재료

### 1. 적혈구세포막 ATPase의 제작

체중 250 Gm내외의 흰쥐를 성에 구별없이 단두치사시켜 heparin (5,000u/100ml)을 항응고제로 하여 채혈하였다. 세포막의 분리는 Dunham 및 Glynn(1961)<sup>3)</sup>의 방법에 준하여 혈액 6ml를 0.15M 식염수 36 ml로 세번 씻어내고 적혈구층을 얻어 30ml의 얼음으로 냉각한 증류수로 용혈을 일으켰다. 증류수는 주사기를 통하여 힘주어 가함으로서 전 적혈구가 잘섞여 용혈되도록 하였다. 이하의 조작은 전부 2°C를 유지하도록 하였다.

용혈된 혈액은 10분간 방치한 다음 20,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 흡인하여 버리고 잔사에 Cysteine 2mM을 함유하는 imidazole buffer(pH 7.5)를 40 ml가 되도록 첨가한 다음 10,000×g로 10분간 원심분리하여 적혈구세포막을 얻었으며 이 적혈구세포막은 같은 buffer로 여섯번 씻어내어 혈액색소를 제거하였다. 이 같이하여 얻어진 엷은 분홍색의 세포막표본은 -20°C에 저장하였다.

### 2. ATPase활성도 측정

각 반응액은 1.5 mM Tris ATP 및 0.25~0.30 mg/ml의 단백질량에 해당되는 적혈구세포막 ATPase를 함유하는 60mM imidazole-HCl buffer (pH 7.5)로서 MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, Cysteine 1mM을 함유시켰으며 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>은 NaCl, KCl로서 실험에서 지시하는 농도를 가하여 최종 반응액 전량 2.5ml로 전체전해질이 160 mM이 되도록 하여 37°C의 항온 수욕조중에서 60분간 반응시킨후 유리된 무기인 (Pi)을 검출하였다.

반응은 10분간 전처치한 다음 ATP를 가했을때부터 시작되게 하였고 반응후 15% trichloroacetic acid를 가함으로서 반응을 종료시켰다.

생성된 Pi는 Horwitz<sup>13)</sup>의 방법에 따르되 cysteine에 의한 영향을 제거하기 위하여 약간의 변법을 사용하였다.

적혈구세포막의 단백질량은 Lowry등<sup>14)</sup>의 방법을 사용하여 측정하였다.

표준반응액의 ATPase활성도를 total-ATPase-activity로 하고 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>을 함유하지 않은 반응액의 ATPase활성도를 Mg<sup>++</sup>-ATPase-activity로 하여 전자에서 후자를 제함으로서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity를 구하였고 ATP-

ase활성도는 mμmoles Pi/mg. protein/hr. 로서 표시하였다.

### 3. 시 약

가) Tris-ATP; 40 Gm의 A6 50W-X8 Resin을 0.4N HCl용액 40 ml에 넣고 5분간 진탕한 다음 씻물만 따라내고 1% 증류수로 다시 5분간 진탕하여 씻물을 따라내어 상등액의 pH가 5.2가 될때까지 반복한 다음 resin을 진공펌프로 흡인하면서 여과하여 말렸다. Na<sub>2</sub> ATP 8 Gm을 25 ml의 물에 녹인 다음 다른 resin에 가하여 15분간 교반한 다음 흡인여과하고 resin은 다시 5 ml의 증류수로 씻어서 흡인여과하여 여액을 합하였다.

여액은 pH가 6.8이 되도록 Tris salt로 적정하여 Tris-ATP를 얻었고 Spectrophotometer를 사용하여 259 mμ에서 함량을 측정하여 -20°C에 보관하였다.

나) 기타 시약은 Sigma 및 Baker회사제의 시약을 사용하여하였고 모든 시약은 유리그릇으로 증류한 증류수를 사용하여 만들었다.

### 3. 실험성적

#### 1) 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase활성에 대한 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>의 영향

흰쥐 적혈구세포막 ATPase활성은 Fig. 1. 에서 표시된바와 같이 효소농도의 증가에 따라 직선적인 관계를 표시 하였으며 K<sup>+</sup>농도(5, 10, 20 및 40 mM)에 따라 큰 차이를 볼 수는 없으나 대체로 K<sup>+</sup>농도가 증가할 수록 ATPase활성이 억제되는 경향을 나타내었고 Na<sup>+</sup>농도를 증가시키에 따라 (10-110mM) ATPase활성도의 증가를

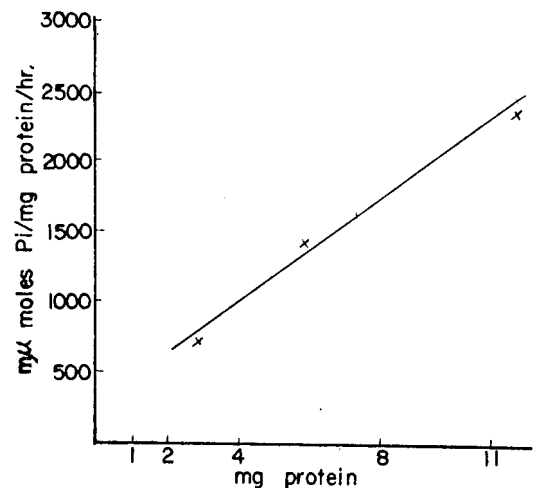


Fig. 1. The effect of enzyme concentration on ATPase activity in rat erythrocyte membranes. Medium contain 60mM imidazole-HCl buffer (pH7.5), Na<sup>+</sup>110 mM, K<sup>+</sup>5mM, Mg<sup>++</sup> 0.5 mM, and cysteine 1mM.

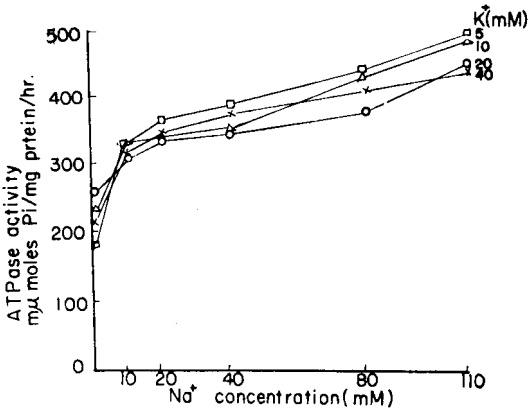


Fig. 2. Effect of  $\text{Na}^+$  on ATP-ase activity in rat erythrocyte membranes at different  $\text{K}^+$  concentrations.

보여(Fig. 2)  $\text{Na}^+$  농도 110 mM에서 최고에 달하였다.

또 흰쥐 적혈구세포막 ATPase활성은  $\text{K}^+$ 이 존재하지 않을 경우  $\text{Na}^+$ 이 존재하더라도  $\text{Na}^+$ 농도의 증가(10~110 mM)로 약간의 증가를 보이기는하나  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ 을 제외하였을 경우와 큰차이를 보이지 않아(Fig. 5) 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase에는  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 이 동시에 존재해야 함을 보여주고 있다.

### 2) 흰쥐 적혈구 세포막 Total ATPase 활성에 대한 Ouabain의 영향

Fig. 3.은 Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의한  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$  각농도에서의 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase에 대한 영향을 보여준다. 즉 Ouabain에 의하여 Total ATPase의 활성은 현저한 억제를 나타내고 있으며 이같은 억제는  $\text{K}^+$ 농도가 낮을수록(5 및 10 mM) 더 현저하고  $\text{K}^+$ 의 증가로(40 mM) 현저히 완화됨을 보여주고 있다.

또 Total ATPase활성은  $\text{Na}^+$ 농도의 증가에 따라(10~110 mM) 큰 변동을 나타내지 않으며  $\text{K}^+$  40 mM에서의 Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의한 억제의 완화는  $\text{Na}^+$ 농도의 증가로 점차 증가하나 저농도의  $\text{Na}^+$ 에서는 정상군에서와 같은 급격한 상승을 보이지 않는다.

### 3) 흰쥐 적혈구 세포막 Total ATPase활성에 대한 Dilantin의 영향

Dilantin( $10^{-4}\text{M}$ )은 Fig. 4.에서와 같이 흰쥐 적혈구세포막 Total ATPase활성의 전체적인 증가를 보였으며 이같은 활성의 증가는 저농도의  $\text{K}^+$ (5mM)과  $\text{Na}^+$ 농도 20 및 40 mM에서 특히 현저하였으나  $\text{Na}^+$ 농도가 증가됨에 따라(80, 110mM)  $\text{K}^+$  각농도(5, 10, 20, 40mM)에서 정상치의 별차이를 나타내지 않으며(Table 1.)  $\text{K}^+$ 농도 20 mM 및 40mM에서는  $\text{Na}^+$ 농도 증가(10~110mM)에 따르는 정상군에서와 같은 증가도 보이지 않는다.

### 4) 흰쥐 적혈구세포막 $\text{Mg}^{++}$ -ATPase에 대한 Dilantin 및 Ouabain의 영향

흰쥐 적혈구세포막의 ATPase활성은 Table 2.에서 보는바와 같이  $\text{Mg}^{++}$ 이 존재하여야만 비로서 그 활성을 나타내고 있으며  $\text{Mg}^{++}$  1.5 및 2.0 mM의 증가로  $\text{Mg}^{++}$  0.5 mM에 비하여 ATPase활성의 증가를 나타내었다.

이같은  $\text{M}^{++}$ -ATPase는 반응액중에  $\text{K}^+$ 이 없을 경우  $\text{Na}^+$ 의 증가(10~110 mM)로서 약간 증가하는 경향을보며 (Fig. 5) Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여는  $\text{Na}^+$  각농도에 서 정상군에 비하여 유의성 있는 차이를 발견할수 없었고 Dilantin( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase활성의 증가를 보여주고 있다.

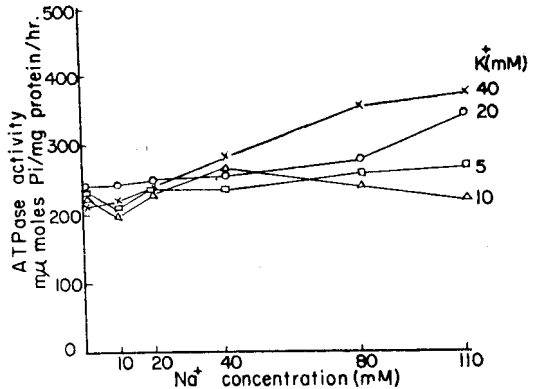


Fig. 3. Effect of  $\text{Na}^+$  on ATPase activity in rat erythrocyte membranes with ouabain at different  $\text{K}^+$  concentrations.

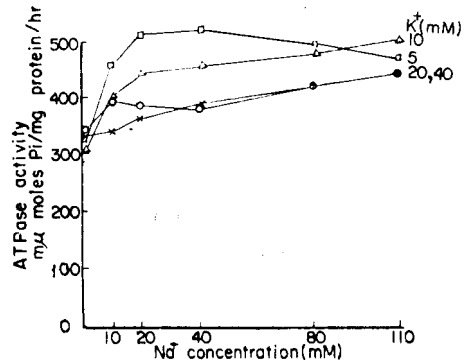


Fig. 4. Effect of  $\text{Na}^+$  on ATPase activity in rat erythrocyte membranes with diphenylhydantoin at different  $\text{K}^+$  concentrations.

### 5) 흰쥐 적혈구세포막 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase활성에 대한 Ouabain 및 Dilantin의 영향

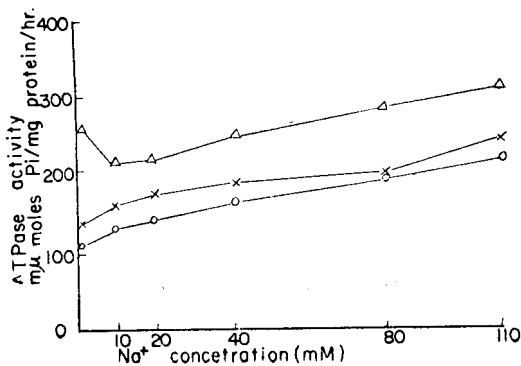
$\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$  각농도에 있어 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase에 대한 Ouabain 및 Dilantin의 영향을 검토

**Table 1.** The effect of diphenylhydantoin and ouabain on rat erythrocyte membranes.

K <sup>+</sup> conc.	Na <sup>+</sup> conc.	Total ATPase activity(A)	(A)+D	% inhibit by D	(A)+Ou	%inhibit by Ou	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase activity(B)	(B)+D	%inhibit by D	(B)+Ou	%inhibit by Ou
5	0	180	330	-83	230	-28	0	—	—	—	—
	10	330	445	-35	210	36	150	125	17	0	100
	20	370	505	-36	230	38	190	175	8	0	100
	40	380	515	-36	230	40	200	185	7	0	100
	80	435	480	-16	255	42	255	150	41	25	91
	110	490	470	4	265	46	310	140	55	35	89
10	0	230	305	-32	220	4	0	—	—	—	—
	10	330	395	-19	195	41	100	90	10	0	100
	20	345	445	-29	230	33	115	140	-22	10	92
	40	350	455	-30	260	26	120	150	-25	40	67
	80	430	475	-10	235	45	200	170	15	15	92
	110	485	505	-4	220	55	255	200	22	0	100
20	0	260	340	-31	240	8	0	—	—	—	—
	10	310	390	-26	245	21	50	50	0	5	90
	20	335	385	-15	248	26	75	45	40	8	89
	40	345	385	-12	250	28	85	45	47	10	88
	80	380	420	-10	275	28	120	80	44	35	71
	110	450	445	2	340	24	190	105	35	100	47
40	0	210	330	-57	210	0	0	—	—	—	—
	10	315	340	-8	215	32	100	10	90	10	90
	20	350	365	-4	240	31	140	30	79	35	75
	40	375	390	-4	280	25	165	65	61	75	55
	80	410	420	-2	350	25	200	85	58	145	27
	110	440	445	-1	370	17	230	115	50	165	28

ATPase activity was expressed by mμmoles Pi/mg. protein/hr.

D; diphenylhydantoin, Ou; ouabain



**Fig. 5.** Effect of diphenylhydantoin and ouabain on ATPase activity in rat erythrocyte membranes without K<sup>+</sup> in medium.

×; normal, Δ; diphenylhydantoin,

○; ouabain

하여 Table 1.에 종합하여 표시하였다.

**Table 2.** The effect of Mg<sup>++</sup> on ATPase activity.

	Mg <sup>++</sup> concentration(mM)			
	0	0.5	1.5	2.0
Na 110 mM K 0 mM	0	110	180	180
Na 80 mM K 5 mM	0	200	225	250
Na 40 mM K 10 mM	0	190	300	285

정상군의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성은 Total ATPase에서와 마찬가지로 K<sup>+</sup> 각농도에서(5, 10, 20 및 40 mM) Na<sup>+</sup>농도의 증가(10~110mM)로 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성의 증가를 나타내었으며 Na<sup>+</sup> 110 mM에서 최고에 달하고 있다.

Ouabain(10<sup>-4</sup>M)은 원위 척형구세포막 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성을 현저히 억제하였으며 K<sup>+</sup>농도가 낮은 5 및 10

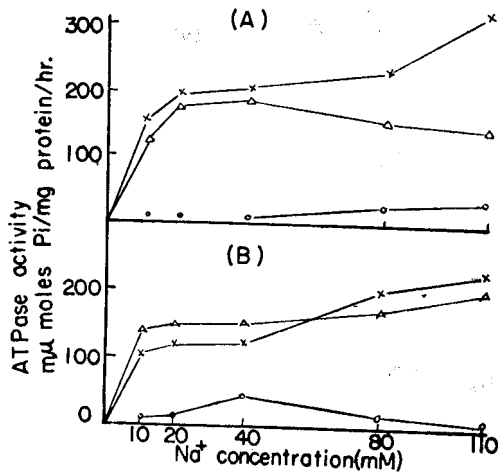


Fig. 6. Effect of diphenylhydantoin and ouabain on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat erythrocyte membranes at K<sup>+</sup> concentration of 5 mM(A), and 10 mM(B).  
×: normal, Δ: diphenylhydantoin, ○: ouabain

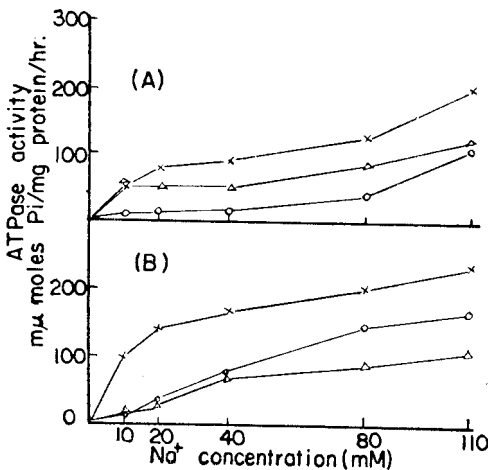


Fig. 7. Effect of diphenylhydantoin and Ouabain on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat erythrocyte membranes at K<sup>+</sup> concentration of 20 mM (A) and 40 mM(B).  
×: normal, Δ: diphenylhydantoin, ○: ouabain

mM에서 가장 현저하였고 (Fig. 6) K<sup>+</sup>농도를 20 및 40 mM로 증가시키에 따라 그같은 억제제가 현저히 완화되었다(Fig. 7). 또 K<sup>+</sup>농도 20 mM 및 40 mM에서 Na<sup>+</sup>농도가 증가할수록 Ouabain(10<sup>-4</sup>M)에 의한 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성의 억제가 더욱 완화되었다.

Dilantin(10<sup>-4</sup>M)은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 K<sup>+</sup>농도가 낮은 5 및 10 mM때 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성의 억제가 현저하지 않거나 또는 ATPase활성의 증가를 나타내었고 Na<sup>+</sup>농도가 증가함에 따라 약간 억제되는것을 볼 수

있다.

또 K<sup>+</sup>농도가 20 및 40 mM로 증가함에 따라 Dilantin(10<sup>-4</sup>M)에 의한 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase활성의 억제가 더 현저하여졌으며 또 Ouabain에 의한 억제가 완화될 수록 Dilantin에 의한 억제가 심해지는 경향을 나타내고 있다.

## 고 찰

어떤 생리적 현상은 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>같은 양이온이 관여하는 제동에 밀접한 관계를 갖으며 또 약리학적으로 효과가 있는 어떤 약물들에서는 이들 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>이동에 영향을 미친다는 점에 착안하여 약물의 작용기전을 규명코저하는 많은 업적들을 볼 수 있다.

적혈구세포막에서의 이온이동은 "energy-rich" phosphate의 분열로 인하여 이루어지는 능동적 이동임은 Caldwell(1956)<sup>15)</sup>, Dunham(1957)<sup>16)</sup> 및 Whittam(1958)<sup>17)</sup>이 보고한 이온이동과 ATP분열량과의 상관관계로 잘 나타나고 있다.

Post등(1960)<sup>2)</sup>도 사람의 적혈구세포막에서 ATPase를 증명하고 이 적혈구세포막 ATPase가 정상 적혈구에서의 이온이동에 관여함을 보고하고 이 ATPase의 활성화에는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 존재가 필요하며 이들 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase는 Ouabain에 의하여 억제되고 또 Ouabain에 의한 ATPase활성의 억제는 K<sup>+</sup>에 의하여 길항됨을 보고한 외에 Dunham과 Glynn(1961)<sup>3)</sup>, Walz와 Chan(1966)<sup>18)</sup>도 역시 사람의 적혈구세포막 ATPase의 활성화와 세포막을 통한 이온이동간에 평행관계가 성립됨을 보고한바 있다.

본실험 결과에서 흰쥐 적혈구세포막에서도 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>이 ATPase를 활성화하고 이들이 Ouabain에 의하여 억제 되었으며 또한 Ouabain에 의한 억제가 K<sup>+</sup>으로 완화 되었음은 Post(1960)<sup>2)</sup>의 결과와 잘 합치하였다.

Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>이 ATPase를 활성화하고 이 ATPase활성에 의하여 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 세포막을 통한 이동이 일어난다면 Ouabain에 의한 ATPase활성 억제현상에 대한 K<sup>+</sup>의 길항작용은 세포외에 존재하는 K<sup>+</sup>과의 길항작용으로 볼 수 있으며 K<sup>+</sup>농도의 증가로 ATPase활성의 억제가 일어나고 있으므로 보아 세포막의 같은 수용체에 대한 작용임을 추측할 수 있다.

일지기 Kahn(1955)<sup>19)</sup>은 angelicalactone등 강심배당체인 Digitalis와 유사한 구조를 갖인 lactone계통의 물질에서도 Digitalis에서와 같이 이온이동을 억제하며 또 이온이동에 관여하는 것으로 생각되는 대사과정을 억제 하더라도 Digitalis에 의한 이온이동에 대한 작용에 별 영향이 없음을 관찰하고 약물의 분자구조와 억제작용과의 관계를 고찰할바 있다.

Glynn(1957)<sup>20)</sup>은 역시 강심배당체가 낮은 농도에서도 사람 적혈구의  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 의 이동을 억제하며 이는 에너지 공급원에 대한 작용이라기 보다는 이온이동기전에 직접 작용할 것이며  $\text{K}^+$ 에 의한 강심배당체와의 상경작용은 같은 수용체에 작용하리라고 시사한 바 있다.

한편 Hoffman(1966)<sup>21)</sup>은 적혈구세포막에서 ATPase에 대한 강심배당체 수용체와  $\text{K}^+$ 간에 상경작용이 있으나  $\text{K}^+$ 수용체와  $\text{K}^+$ 이동 장소와는 다르다고 지적 하였다.

Post등(1966)<sup>22)</sup>이 세포막 ATPase활성에는  $\text{Mg}^{++}$ 이 있어야 한다고 한바와같이 본실험 결과에서도 역시  $\text{Mg}^{++}$ 이 없을 경우  $\text{Na}^+$  및  $\text{K}^+$ 에 의하여 ATPase의 활성이나 타나지 않았으며 Rawson과 Pincus(1968)<sup>23)</sup>는 흰쥐 뇌의 microsomal fraction에서 Ouabain과 Dilantin이  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase활성에 별 영향을 미치지 않는다고 하였으나 본실험 결과에서 Ouabain은 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase에 별 영향을 미치지 않았고 Dilantin은  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase활성을 증가시킴을 보였다.

Woodbury(1955)<sup>11)</sup>가 정상 흰쥐에서 Dilantin은 뇌에서 세포내 및 전체  $\text{Na}^+$ 량을 저하시키고 방사성  $\text{Na}^{24}$ 의 뇌세포내로의 이동속도를 증가시킴을 관찰하고 급성적으로 hyponatremia를 만들었을때 세포내  $\text{Na}^+$ 의 증가와  $\text{K}^+$ 의 감소를 나타내었고 이같은 현상은 Dilantin에 의해 방지되었다고 보고하였으며 본실험에서 반응액중  $\text{Na}^+$ 농도가 낮을 경우 Dilantin에 의하여 Total ATPase 및  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase활성의 증가를 보이는 것으로 미루어 Dilantin의 경련에 대한 작용은 세포에서의  $\text{Na}^+$ 의 능동적 이동에 관여하는 대사과정을 자극함에 의한다고 보겠다.

Mosey와 Tyler(1954)<sup>23)</sup>는 개에서 Digitalis에 의하여 유발된 심실빈맥이 Dilantin으로 효과적으로 치유됨을 보고하고 최근 Lang등(1965)<sup>24)</sup>은 Digitalis에 의하여 유발되는 심장부정맥에 대한 Dilantin의 임상적 치료가치를 보고한 바 있다.

Helfant(1967)<sup>25)</sup>는 Dilantin의 심장에서의 전기 생리학적인 검토를 통하여 Dilantin이 정상 또는 Digitalis에 중독된 심장에서의 심실자동능을 심히 감퇴시키고 Digitalis에 의하여 발생하는 A-V block을 저하시킴으로서 Digitalis와 길항적으로 작용함을 보고하였다.

Helfant(1968)<sup>12)</sup>는 이어 심방과 심실에서의 심근  $\text{K}^+$ 의 차이를 관찰하여 중독량의 Digitalis가 심근에서의  $\text{K}^+$ 소실을 초래하며 Dilantin투여로서 심근  $\text{K}^+$  소실 및 심장부정맥이 방지되었음을 관찰하고 Digitalis에 의한

심장에 대한 중독현상은 세포막을 통한 이온이동기전을 억제함으로써 심근  $\text{K}^+$ 소실로 초래되며 Dilantin에 의한 Digitalis 중독치료효과는 위의 이온이동기전의 복원에 의한다고 시사한바 있으며 본실험에서 저농도의  $\text{Na}^+$ 이 존재하는 반응액에서 Dilantin이  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase의 활성을 증가시키는 현상과 Digitalis에 의한 억제가 심할수록 Dilantin에 의한 ATPase 활성의 증가가 나타나고 있음으로 보아 Digitalis와 Dilantin의 이온이동기전에 대한 길항작용을 추측할수 있겠으나 Dilantin과 Digitalis의 ATPase에 대한 작용이 수용체에 대한 작용인지의 여부는 좀더 추구해야 될 문제로 사유된다.

### 5. 결 론

1) 흰쥐 적혈구세포막 ATPase활성에 대한 Ouabain 및 Dilantin의 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

2) 흰쥐 적혈구세포막 ATPase활성은  $\text{Na}^+$ 량의 증가로 각농도의  $\text{K}^+$ (5, 10, 20, 및 40 mM)에서 증가 되었으며  $\text{K}^+$ 농도가 증가함에 따라 ATPase활성이 억제되는 경향을 보였다.

3) 흰쥐 적혈구세포막의 Total ATPase활성은 Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여 억제되었으며 이는  $\text{K}^+$ 농도의 증가로 완화되었다.

4) 흰쥐 적혈구세포막의 Total ATPase활성은 Dilantin( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여  $\text{Na}^+$ 농도가 낮을 경우 현저한 증가를 나타내었고 이는  $\text{K}^+$ 농도가 낮을수록 더욱 현저하였다.

5) 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Mg}^{++}$ -ATPase는 Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여 별 변화를 보이지 않으나 Dilantin( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여 증가됨을 보았다.

6) 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase활성은 Ouabain( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여 현저히 억제되었으며  $\text{K}^+$ 농도가 낮을 경우 거의 완전한 억제를 보였다.

7) 흰쥐 적혈구세포막  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase활성은  $\text{K}^+$  농도가 낮을때 Dilantin( $10^{-4}\text{M}$ )에 의하여 별 억제를 보이지 않거나 약간 증가되었으며 Ouabain에 의한 억제가 완화 될수록 Dilantin에 의한 억제가 심하여지는 경향을 보였다.

8) 이상 실험을 통하여 Ouabain과 Dilantin의 세포막 이온이동기전에 대한 작용의 일부를 고찰하였다.

## ABSTRACT

### The Effects of Diphenylhydantoin on Adenosine Triphosphatase Activity in Rat Erythrocyte Membranes

Jung Yoon Lee, M. D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

(Directed by Prof. Jin Sup Oh, M. D., Ph. D.)

The effects of diphenylhydantoin on ATPase activity in rat erythrocyte membranes were studied and also influence of  $K^+$  on ATPase activity was studied.

The ATPase activity of rat erythrocyte membranes has been shown to consist of two components.

The first component requires the  $Mg^{++}$  in the absence of  $Na^+$  or  $K^+$  ( $Mg^{++}$ -ATPase) and is not inhibited by ouabain and stimulated by diphenylhydantoin.

The second component requires the presence of  $Mg^{++}$  and also  $Na^+$  or  $K^+$  ( $Na^+$ - $K^+$ -ATPase). It is inhibited by ouabain and is stimulated by diphenylhydantoin in low  $Na^+$  concentration and inhibited in high  $Na^+$  concentration.

Potassium ion reverse the  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase which is inhibited by ouabain.

Ouabain and diphenylhydantoin show reversed effect to  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase activity.

It suggests that the therapeutic effect of diphenylhydantoin on digitalis induced cardiac arrhythmia may be resulted from their effect on ion transport mechanism of cell membrane.

And the relevance of these findings to the action of ouabain and diphenylhydantoin on membrane transport mechanism is discussed.

## REFERENCES

1. Schatzman, H. J. : *Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocytenmembran. Helv. physiol. acta*, 11:346-354, 1953.
2. 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.
3. Caldwell, P. C., Hodgkin, A. L., Keyenes, R. D. and Shaw, T. I. : *The effects of injecting 'energy-rich' phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of Loligo. J. Physiol.*, 152:561-590, 1960
4. Dunham, E. T. and Glynn, I. M. : *Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. J. Physiol.*, 156:274-293, 1961.
5. Hoffman, J. F. : *The link between metabolism and the active transport of  $Na^+$  in human red cell ghosts. Fed. Proc.*, 19:127, 1960.
6. Skou, J. C. : *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta*, 23:394-401, 1957.
7. Repke, K., Est, M., and Portius, H. J. : *Über die Ursach der Speciesunterschiede in der Digitalis empfindlichkeit. Biochem. Pharmacol.*, 14:1785-1802, 1965.
8. Goodman, L. S., and Gilman, A. : *The pharmacological basis of therapeutics (3rd ed.)*, New York, Mactillan, 1965, p. 219.
9. Conn, R. D. : *Diphenylhydantoin sodinm in cardiac arrhythmias. New Engl. J. Med.*, 272:277-282, 1965.
10. Bernstein, M. D., Gold, H., Lang, T. W., Rappelbaum, S., Bazika, V., and Corday, E. : *Sodium diphenylhydantoin in the treatment of recurrent cardiac arrhythmia. J. Amer. Med. Ass.*, 191:695-697, 1965.
11. Woodbury, D. M. : *Effects of diphenylhydantoin on electrolytes and radiosodium turnover in brain and other tissues of normal, hyponatremic and postictal rats. J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 115: 74-95, 1955.
12. Helfant, R. H., Ricciutti, M. A., Scherlag, B. J., and Damato, A. N. : *Effect of diphenylhydantoin sodium (Dilantin) on myocardial A-V potassium difference. Amer. J. Physiol.*, 214:880-884, 1968.
13. Horwitt, B. N. : *Determination of inorganic serum phosphate by stannous chloride. J. Biol. Chem.*, 193:537-541, 1952.

14. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
15. Caldwell, P.C.: *The effect of certain metabolic inhibitors on the phosphate esters of the squid giant axon*. *J. Physiol.*, 132:35, 1956.
16. Dunham, E.T.: *Parallel decay of ATP and active cation fluxes in starved human erythrocytes*. *Fed. Proc.*, 16:33, 1957.
17. Whittam, R.: *Potassium movements and ATP in human red cells*. *J. Physiol.*, 140:479-497, 1958.
18. Walz, F.G., and Chan, P.C.: *Adenosine triphosphate-dependent retention of sodium ions by sodium and potassium-activated adenosinetriphosphatase preparation from erythrocyte membranes*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 113:569-574, 1966.
19. Kahn, J.B., and Acheson, G.H.: *Effects of cardiac glycosides and other lactones, and certain other compounds, on cation transfer in human erythrocytes*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 115:305-318, 1955.
20. Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells*. *J. Physiol.*, 136:148-173, 1957.
21. Hoffman, J.F.: *The red cell membrane and the transport of sodium and potassium*. *Amer. J. Med.*, 41:666-680, 1966.
22. Rawson, M.D. and Pincus, J.H.: *The effect of diphenylhydantoin on sodium, potassium, magnesium-activated adenosine triphosphatase in microsomal fractions of rat and guinea pig brain and on whole homogenates of human brain*. *Biochem. Pharmacol.*, 17:573-579, 1968.
23. Mosey, L., and Tyler, M.D.: *Effect of diphenylhydantoin sodium, procaine hydrochloride, procaine amide hydrochloride and quinidine hydrochloride on ouabain induced ventricular tachycardia in unanesthetized dogs*. *Circulation*, 10:65, 1954.
24. Lang, T.W., Bernstein, M.D., Barbieri, F., Gold, H., and Corday, E.: *Digitalis toxicity: treatment with diphenylhydantoin*. *Arch. Inter. Med.*, 116:573, 1965.
25. Helfant, R.H., Scharlag, B., and Damato, A.N.: *The electrophysiological properties of diphenylhydantoin sodium as compared to procaine amide in the normal and digitalis-intoxicated heart*. *Circulation*, 36:108-118, 1967.