

Barbiturate系 物質이 燐脂質 人工細胞膜의 流動性에 미치는 影響

機器分析科

李庚心·朴炳許·權東敏·崔圭相

Effects of Barbiturates on the Fluidity of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Unilamellar Liposomes.

Instrumental Analysis Division

K. S. Lee, B. J. Park, D. M. Kwon, K. S. Choi

Abstracts

To get a better insight into the molecular mechanism of action of barbiturates, the effects of barbiturates on the fluidity of phosphatidyl ethanolamine and phosphatidylserine model membranes were investigated employing the fluorescence probe technique. Employed barbiturates are pentobarbital. Na, Hexobarbital. Na, amobarbital. Na, and phenobarbital. Na, and the following results were obtained.

Barbiturates increased the fluorescence polarization(P), rotational relaxation time(\bar{P}) of DPH in a dose-dependent manner.

In PE and PS model membranes, the relative potencies of barbiturates to order the bilayers were in the order : pentobarbital. Na, >hexobarbital. Na>amobarbital. Na>phenobar-

bital. Na.

Barbiturates decreased the Py-3-Py fluorescence intensity ratio I'/I , in a dose-dependent manner. Hence, it is concluded that barbiturates have ordering effects on SPMVPE and SPMVPS model membranes.

I. 緒 論

最近 生理活性物質의 作用機轉 研究에서 이들 物質과 受容體(receptor)와의 相互作用 못지 않게 生體膜의 流動性에 미치는 效果와 物質의 非特異的인 作用이 매우 重要한 것으로 認識 되고 있다.

Loh等¹⁾은 生體細胞膜의 流動性 變化는 細胞膜의 機能을 變化시키고 細胞膜의 機能變化는 細胞膜의 流動性變化를 招來²⁾하며 또, 生體膜의 流動性은 生體膜에 存在하는 運搬系(carrier system), 酵素(enzyme), 受容體(receptor), 認識部位(recognition site)등의 機能에 大端히 큰 影響을 미쳐 生理活性에 重要한 役割을 하는 것으로 報告한 바 있으며, 이에 對한 研究가 활발하게 進行되고 있는 實情이다.

不安 또는 不安과 관련된 身體的, 精神的 不調和를 완화시키는데 利用되어온 合成物質중 가장 널리 알려진 物質인 Barbiturates(BBT)와 그 誘導體들은 化學構造가 다양함에도 불구하고 共히 비특이적인 중추신경계 抑制作用을 가역적으로 일으키기 때문에 이들 物質의 공통적 인 生理化學的 性質인 높은 脂溶性이 生理的 反應에 직접 또는 간접적으로 參與할 것으로 推定되어 왔으며 barbiturate系 物質이 疎水性部位(지방 및 단백질)에 축적 되었을때 物理的 機轉에 의하여 細胞膜이 확장됨에 起因³⁾된다고 한다.

本 研究에서는 barbiturates의 分子의 生理作用 機轉 研究에 기초자료를 제공하는데 있을 뿐만 아니라 脂肪酸 造成變化와 cholesterol 含量變化는 細胞膜의 流動性 變化에 影響을 미치기 때문에 磷脂質로 構成된 人工細胞膜의 流動性에 미치는 barbiturates의 影響을 檢討하기 위해 소(牛)의 신선한 대뇌피질로 부터 synaptosomal plasma membrane vesicles(SPMV)를 分離하고 이 SPMV로 부터 phosphatidylethanolamine(PE)와 phosphatidylserine(PS)을 分離 抽出하여 PE, PS의 人工細胞膜을 만든후 이들 人工細胞膜의 流動性에 미치는 barbiturates의 影響을 형광 probe法으로 測定하였다. 形광 probe로는 疎水性 中心部의 측방확산(lateral diffusion)을 주로 반영해 주는⁴⁾ 1,3-di(1-pyrenyl) propane(Py-3-Py)과 人工細胞膜 등의 中心部 회전 확산(rotational diffusion)을 주로 반영해 주는⁵⁾ 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)를 利用하여 形광분석법으로 phosphatidylethanolamine(PE)과 phosphatidylserine(PS) 人工細胞膜의 流動性에 미치는 barbiturates의 影響을 檢討, 觀察하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

本 實驗에 利用한 phosphatidylethanolamine(PE)와 phosphatidylserine(PS)는 소(牛)의 신선한 대뇌피질로 부터 分離한 synaptosomal plasma membrane vesicles(SPMV)에서 抽出한 것을 使用하였으며, 형광 probe인 1,6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene(DPH), barbiturates (thiopental sodium, pentobarbital sodium, hexobarbital sodium, amobarbital sodium, phenobarbital sodium), 脂質分析用 標準品 및 本 實驗에 利用한 모든 試藥은 特級試藥(Sigma Chem Co 製品)을, 물은 재 증류하여 使用하였다.

2. Synaptosomal plasma membrane Vesicles의 分離

SPMV의 分離는 Fontaine等²²의 方法에 따라 소(牛)의 신선한 대뇌피질 50g을 取하여 부의 比로 10배의 0.32M sucrose HEPES(pH 7.5) 용액으로 2번 세척한 후 homogenizer를 利用하여 均質化시켜 이 均質溶液을 3200rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액을 取하여 다시 1200rpm에서 12分間 원심분리 시켰다. 이렇게하여 얻은 pellet를 125ml의 0.32M sucrose HEPES 용액(pH 7.5)으로 세척한 후 12000rpm에서 12분간 원심분리시킨 다음 10등분으로 나누어 각각에 0.32M sucrose 용액 8ml 넣어 재현탁시켰으며, 이 재현탁액을 0.32M sucrose HEPES 용액속의 7.5% (w/v), 12% Ficoll 용액(w/v)에 다 층이 지게 넣었다.

이렇게 層이 형성된 溶液을 19,000rpm에서 1시간동안 원심분리시켜 7.5% 12% Ficoll 용액 사이에 存在하는 synaptosome band를 取한 후 0.32M sucrose 용액으로 희석 시켰다. 이 희석 용액을 18120×g에서 20分間 재원심분리시켜 synaptosome을 얻었으며 이를 다시 저장성용액 (hypotonic solution)인 6mM tricin (pH 8.1)에 현탁시켜 터뜨렸다(lysis) 이것을 다시 39000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 pellet을 取하여 Lowry法²³에 따라 Bovine Serum Albumin을 標準品으로 하여 SPMV 단백질 농도를 測定한 다음 -70℃로 유지 시켜 저장하였다.

3. Synaptosomal plasma membrane vesicles로 부터 phosphatidylethanolamine과 phosphatidylserine의 抽出 分離

SPMV 500ml를 取하여 methanol 200ml를 加하고 상온에서 5分間 진탕한 후 chloroform 200 ml를 加하여 다시 5分間 진탕혼화하였다.

이들 2000×g에서 10分間 원심분리하여 상등액을 取하고 抽出한 脂質을 정제하기 위하여 chloroform層을 取해 감압하에서 용매를 증발시켰다. 抽出物인 脂質을 取하여 CHCl₃-

CH₃OH-NH₄OH(65:25:5)을 展開溶媒로하여 Thin Layer Chromatography(TLC)를 통해 phosphatidylethanolamine과 phosphatidylserine을 얻었다. 또 TLC를 통해 分離된 磷脂質은 70% HClO₄를 가하여 180°C에서 2시간 반응시켜 Bartlett法¹⁰에 따라 精製하였다.

4. 人工細胞膜의 製造

人工細胞膜 製造는 抽出分離한 phosphatidylserine과 phosphatidylethanolamine을 각각 56 mg 取하여 chloroform에 溶解시킨 후 H₂gas를 흘려보내면서 減壓下에서 증류하여 건조피막을 만들고 잔류용매는 H₂gas를 통과시켜 除去하였다. 얇은 film형으로 된 脂質에 80ml의 phosphate buffered saline 溶液을 加한후 vortexer로 均질시켜 다중층 리포솜(multilamellar liposomes)을 만들고 이것을 sonicator(model No. 9100)로 2分間 分解시켜 15000rpm에서 30分間 원심분리하여 그 상등액을 取해 試料用 단일리포솜(unilamellar liposomes)으로 使用하였다.

5. 1,3-di(1-pyrenyl) propane(py-3-py)를 利用한 流動性 測定

1) Excimer kinetics.

형광 probe인 1, 3-di (1-pyrenyl) propane은 한 分子内에서 excited aromatic group과 unexcited aromatic group이 結合되어 있기 때문에 monomer 형광에 對한 excimer quantum yield 比는 ϕ'/ϕ 로 나타 낼수있고 이는 monomer 형광 세기(I)에 對한 excimer 형광세기(I')의 比(I'/I)에 비례하므로 다음 式으로 표시할 수 있다.

$$\frac{I'}{I} \approx \frac{\phi'}{\phi} = \frac{Kf'}{Kf} \cdot \frac{K_a}{K_d + k_f'}$$

여기서 k_f' , k_f , k_a 및 k_d 는 각각 excimer 형광, monomer형광, excimer형성, excimer분해 반응의 속도 상수이며 k_d 는 $K_d=0$ 일 때의 excimer 형광수명(lifetime)이다.

2) 1, 3-di(1-pyrenyl) propane의 溶입(incorporation) -70°C 이하에서 저장해 두었던 人工細胞膜 적당량을 取한 후 여기에다 PBS溶液을 加하여 1ml當 脂質농도가 0.54mg이 되도록 조절하고 pH 7.4로 유지시킨 溶液에 Py-3-Py 저장용액을 적당량 加하여 그 최종농도가 $5 \times 10^{-7}M$ 되도록 조절한 후 4°C이하에서 magnetic stirrer로서 가볍게 흔들면서 溶입하였다.

3) 流動性 增減 測定

Py-3-Py가 溶입된 人工細胞膜 溶液(pH 7.4) 4ml를 取하여 형광분석기의 試料用 cell에 넣은 후 온도를 37°C로 고정시킨 상태에서 Py-3-Py의 monomer 형광세기에 對한 excimer 형광세기의 比를 測定하여 流動性 增감을 測定하였다. 이때 excitation은 330nm에서 corrected

fluorescence emission은 monomer형광세기(I)의 경우 379nm에서 excimer 형광세기(I')은 480nm에서 測定하였다.

6. 1, 6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)를 이용한 流動性 測定

1) 형광 probe 봉입

人工細胞膜에 PBS를 加하여 pH7.4로 調整하고 DPH저장용액을 脂質 1mg當 DPH농도가 1 mg이 되도록 加한 후 5分間 가볍게 흔들어 봉입하였다.

2) DPH의 형광 測定

형광분석기와 試料의 條件은 py-3-py 測定時와 동일하였다. 다만 DPH의 excitation은 362nm에서, corrected emission형광 세기는 424nm에서 測定하였으며 형광분석기의 polarizer를 통하여 試料에다 수직으로 편광(vertically polarized light)된 빛으로 excitation시킨 후 excitation시킨 방향과 평행된 방향의 corrected emission 형광세기 ($I_{||}$)와 excitation시킨 방향에 對하여 수직방향의 corrected emission 형광세기(I_{\perp})를 測定하여 polarization(P), steady-state anisotropy(r)를 구하였다.

단, p와 r은 다음 (1)式과 (2)式으로부터 구하였다.

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad \text{--- (1)}$$

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad \text{--- (2)}$$

DPH의 형광수명(fluorescence lifetime)은 6, 8 및 30MHZ에서 phase-modulation method로 測定하였다. rotational relaxation time(\bar{P})는 다음의 perrin equation에 代入하여 구하였다.

$$\left(\frac{1}{r} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{3}{\bar{P}}\right)$$

여기서 r은 (2)式의 값이며 \bar{P} 는 rotational relaxation time이다. r_0 는 DPH 최대의 anisotropy 값으로 Harris에 의하여 보고된 값 0.362였다.

III 實驗結果 및 考察

1. SPMV로 부터 PE와 PS의 抽出 分離

SPMV로부터 抽出한 脂質抽出物을 一定量 取하여 $\text{CHCl}_3-\text{CH}_2\text{OH}-\text{NH}_4\text{OH}(65:25:5)$ 를 展開溶媒로 TLC를 통해 分離하였다.

2. Barbiturates가 人工細胞膜의 側傍擴散에 미치는 影響

SPMV로 抽出 分離한 PE와 PS로 형성시킨 人工細胞膜에 barbiturates를 加하여 濃도에 따른 I'_{\perp}/I_{\parallel} 의 값을 얻어 Fig 1, 2에 나타내었다. 즉, barbiturates 濃도가 증가함에 따라 I'_{\perp}/I_{\parallel} 의 값이 감소된다는 것이 確認되었다. 또 PE와 PS로 형성된 人工細胞膜에서는 實驗에 적용한 모든 barbiturates가 10mM 濃도에 도달해서야 비로서 有意的인 I'_{\perp}/I_{\parallel} 값 감소를 나타내었고 PE 人工細胞膜의 경우에는 實驗에 적용한 barbiturates 모두가 5.0mM 濃도에서 有意性있는 I'_{\perp}/I_{\parallel} 값 감소를 나타내었다. 그러나 PS 人工細胞膜의 경우에는 Pentobarbital sodium만이 5.0mM의 濃도에서 I'_{\perp}/I_{\parallel} 값이 有意性 있게 감소되었다.

3. Barbiturates가 PE와 PS 人工細胞膜의 polarization(P) 및 rotational relaxation time(\bar{P})에 미치는 影響 PE와 PS 人工細胞膜에 DPH를 溶입(incorporation) 시킨 후 polarizer를 통하여 DPH를 excitation 시켜 corrected emission 螢光세기(I_{\perp})를 測定하고 또 다른 polarizer를 이용하여 corrected emission 螢光세기(I_{\parallel})를 測定하여 實驗方法에서 제시된 式에 代入하여 polarization(P)을 구하여 PE 人工細胞膜의 경우 Fig. 3에 PS 人工細胞膜의 경우 Fig. 4에 나타내었다. 즉 barbiturates 濃도가 증가함에 따라 PE, PS 人工細胞膜에 적용된 polarization(P)은 증가하는 경향을 나타냈으며 그중 PE 人工細胞膜에 대해서는 barbiturates 濃도가 5.0mM에서 有意的인 값의 증가를 나타내었고, PS 人工細胞膜에 대해서는 10mM 濃도에서 有意한 값의 증가를 관찰할 수 있었다. DPH의 corrected emission치인 I_{\perp} 와 I_{\parallel} 및 螢光수명을 Perrin equation에 대입하여 rotational relaxation time(\bar{P} , nsec)에 미치는 영향을 구하여 Fig5, 6에 나타내었다. 즉 barbiturates의 濃도가 증가함에 따라 PE 및 PS 人工細胞膜에 적용된 rotational relaxation time(\bar{P} , nsec)의 값은 共히 증가하는 경향을 나타내었으며 두 膜에 대한 barbiturates의 濃도가 5.0mM에서 共히 有意的인 값의 증가를 볼수 있었다. 以上の 實驗結果를 綜合하여 보면 synaptosomal plasma membrane vesicles에서 抽出分離해서 만든 人工細胞膜의 polarization(P), rotational relaxation time(\bar{P} , nsec)의 값은 barbiturates 濃도에 비례하여 증가함을 관찰할 수 있었으며 또 本 研究에서 利用된 Py-3-Py와 DPH는 人工細胞膜의 측방확산과 회전확산을 잘 反映해 주는 螢光 probe라는 것을 알수 있었다.

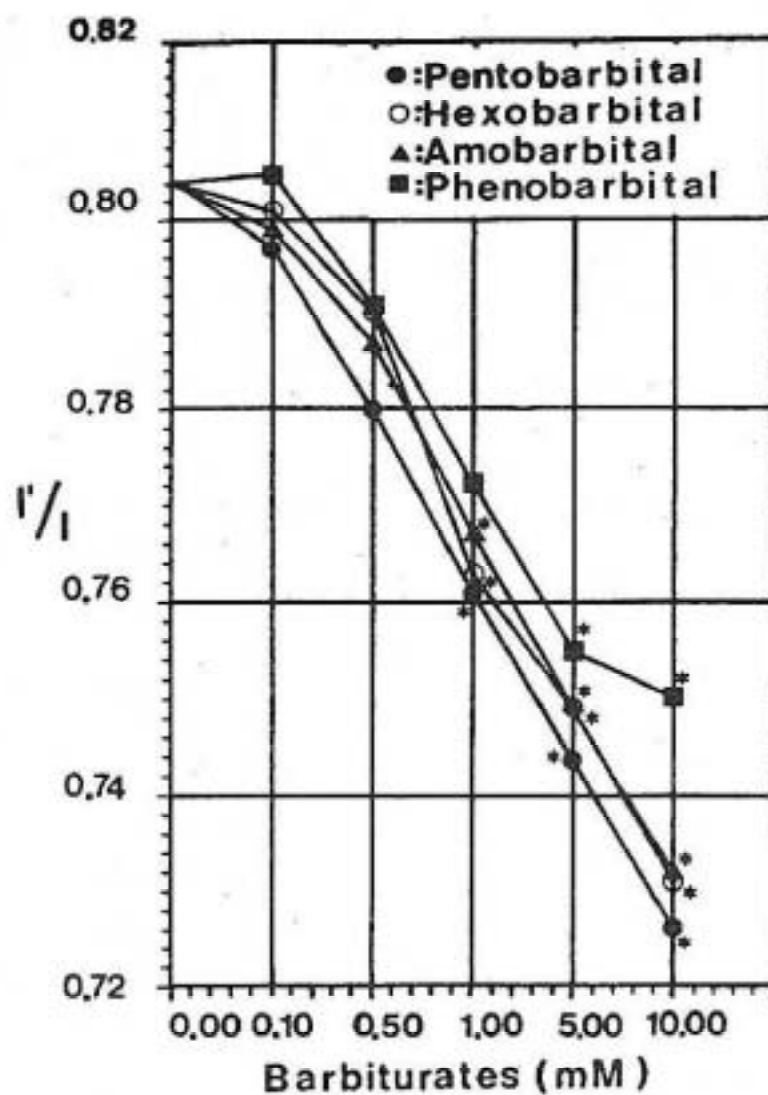


Fig. 1 Effects of barbiturates on the excimer to monomer fluorescence intensity ratio, I' / I , of 1, 3-di(1-pyrenyl) propane incorporated into SPMVPE unilamellar liposomes.

Fluorescence measurements were performed at 37°C. Each point represents the mean \pm SEM of 5 determinations. An asterisk signifies $p < 0.05$ according to Student's t -test.

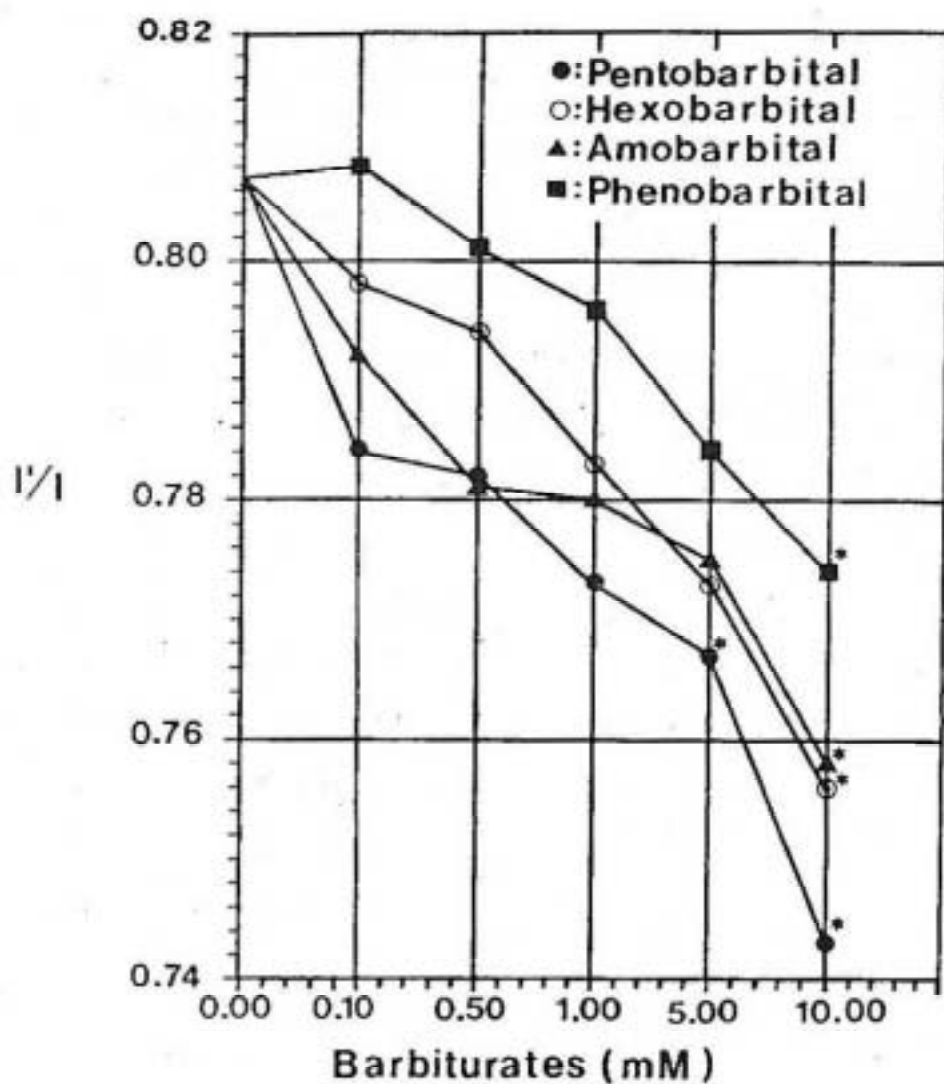


Fig. 2 Effects of barbiturates on the excimer to monomer fluorescence intensity ratio, I^1 / I , of 1, 3-di(1-pyrenyl) propane incorporated into SPMVPS unilamellar liposomes.

Fluorescence measurements were performed at 37°C. Each point represents the mean \pm SEM of 4 determinations. An asterisk signifies $p < 0.05$ according to Student's t-test.

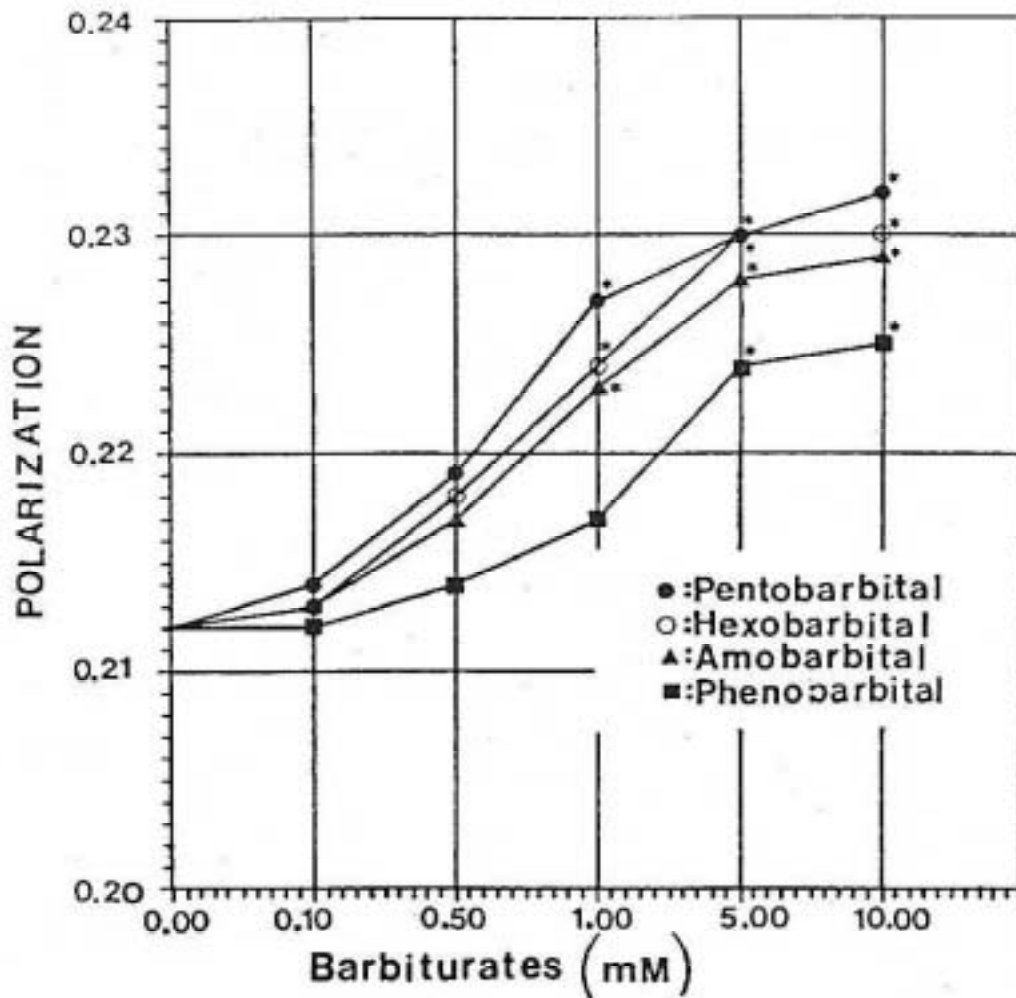


Fig. 3 Effects of barbiturates on fluorescence polarization (\bar{P}) of DPH in liposomes of membrane phosphatidylethanolamine fraction.

Fluorescence measurements were performed at 37°C.

Each point represents the mean \pm SEM of 4 determinations.

An asterisk signifies $P < 0.05$ according to Student's t-test.

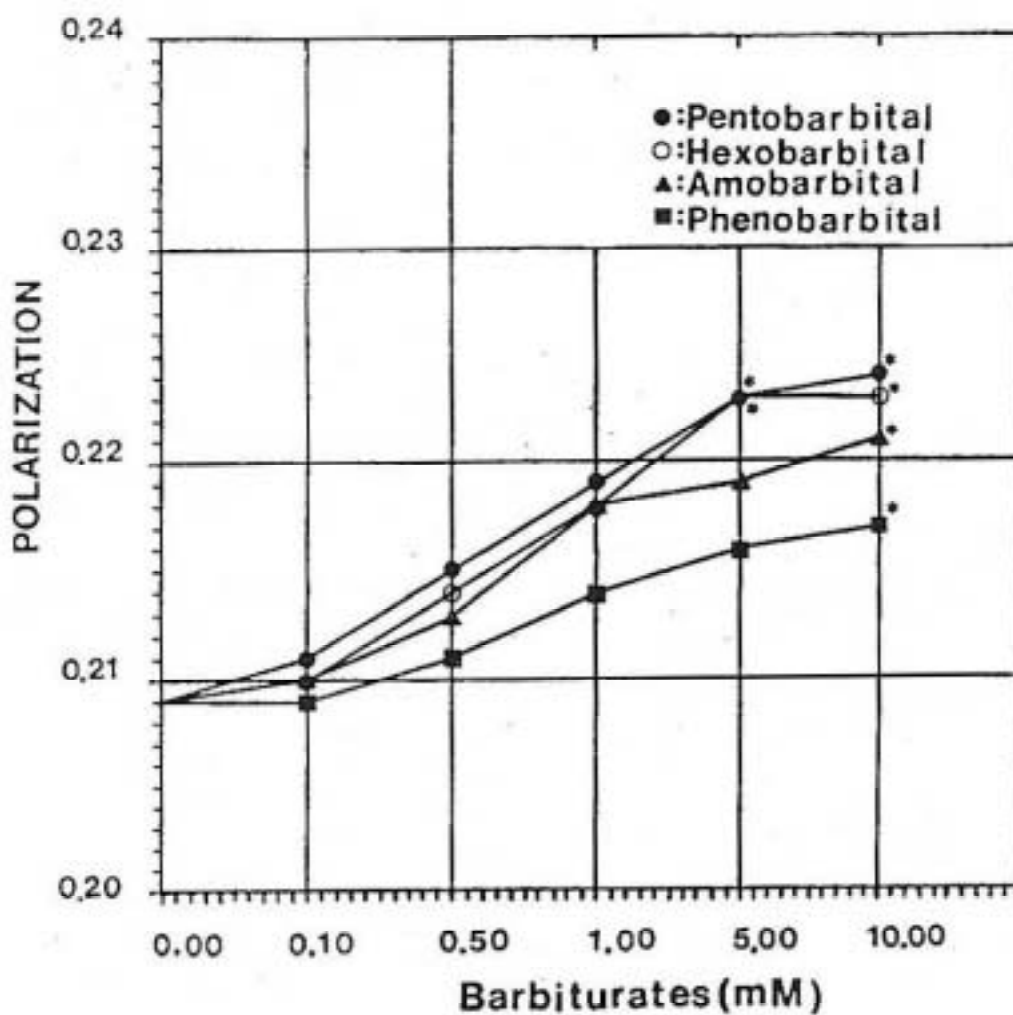


Fig. 4 Effects of barbiturates on fluorescence polarization(\bar{P}) of DPH in liposomes of membrane phosphatidylserine fraction.

Fluorescence measurements were performed at 37°C.

Each point represents the mean \pm SEM of 4 determinations.

An asterisk signifies $P < 0.05$ according to Student's t-test.

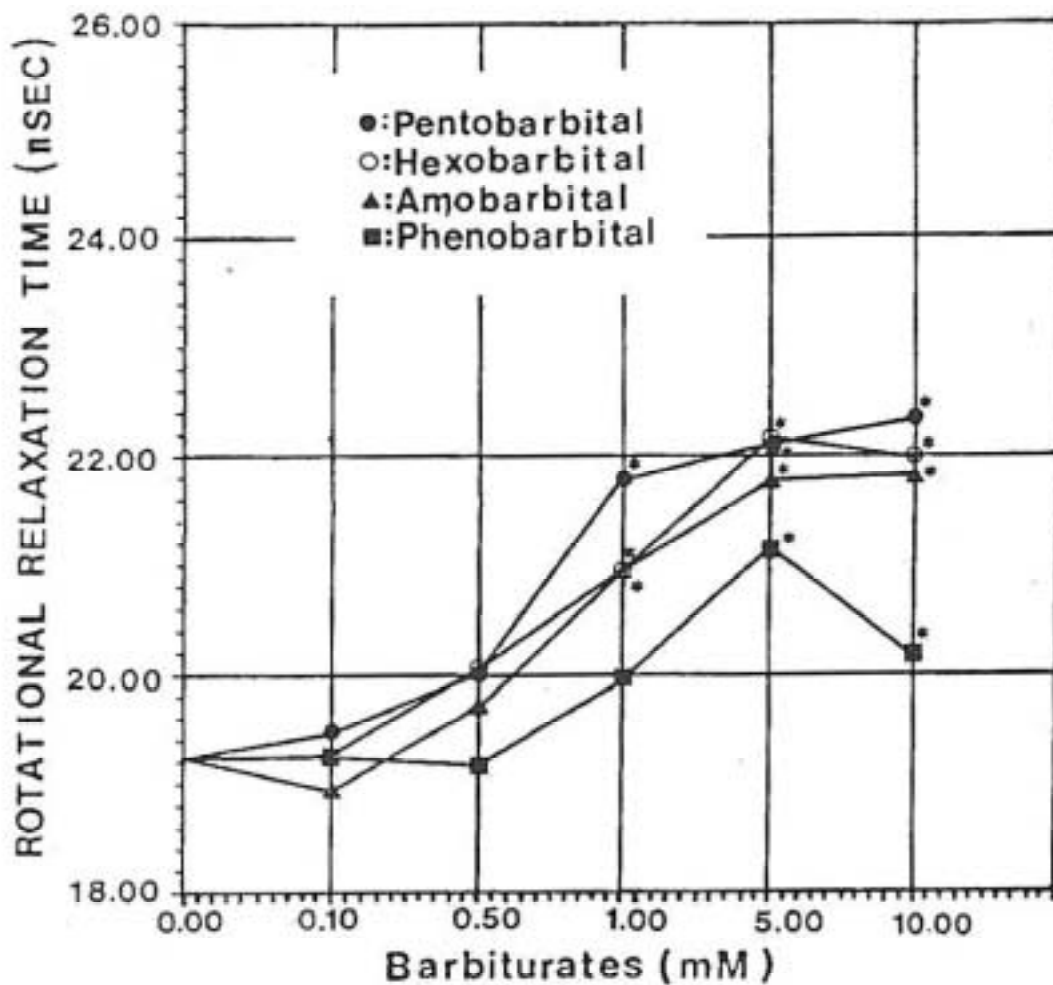


Fig. 5 Effects of barbiturates on rotational relaxation time(\bar{P}) of DPH in liposomes of membrane phosphatidylethanolamine fraction.

Fluorescence measurements were performed at 37°C.

Each point represents the mean \pm SEM of 4 determinations.

An asterisk signifies $P < 0.05$ according to Student's t-test.

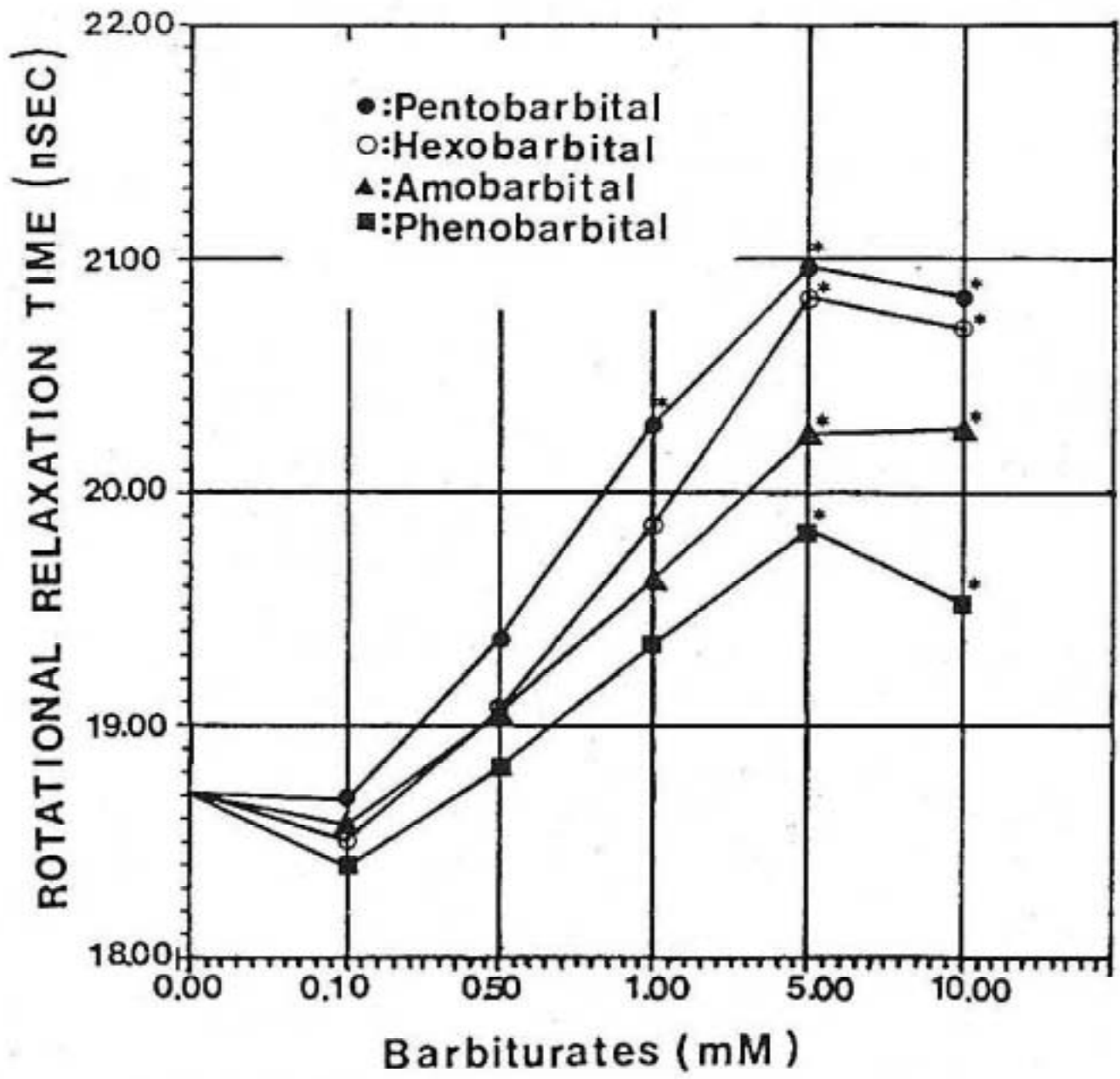


Fig. 6 Effects of barbiturates on rotational relaxation time(\bar{P}) of DPH in liposomes of membrane phosphatidylserine fraction.
 Fluorescence measurements were performed at 37°C.
 Each point represents the mean \pm SEM of 4 determinations.
 An asterisk signifies $P < 0.05$ according to Student's t-test.

参 考 文 献

1. /Loh, H. H. and Loh, P. Y., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20, 201(1982).
2. /Goldstein, D. B., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, 43(1984).
3. /Castuma, C. E. and Brenner, R. R., *Biochem. Biophys. Acta*, 729, 9(1983)
4. /Hirayama, F., *J. chem. phys.*, 42, 3163(1965)
5. /Eachariasse, K. A., *chem. phys. Lett.*, 57, 429(1978)
6. /Vadels, F., *Life Sci.*, 29, 1985(1981).
7. /HO, I. K. and Harris, R. A., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 83(1972)
8. /Emert, J., Behrens, C. and Goldenberg, M., *J. Am. chem. soci.*, 101, 771(1979)
9. /Melnick, R. L., Haspel, H. C., Goldenberg, M., Greenbaum, L. M. and weinstein, S., *Biophys. J.*, 34, 499(1981)
10. /Lakowicz, J. R., cherek, H. and Balter, A., *J. Biochem. Biophys. Meth.* 5, 131(1981)
11. /Andrich, M. P. and Vamderkooi, J. M., *Biochemistry*, 15, 1257(1976).