

# 고사리 根莖의 hot ethanol-water soluble fraction 이 家兔赤血球膜의 Na-K-ATPase 活性도에 미치는 影響

梁 奇 千

## Influence of the Hot Ethanol-Water Soluble Fraction of Bracken Rhizome on Na-K-Adenosine Triphosphatase Activity in Rabbit Red Cell Membrane

*Ki-chun Yang*

### Summary

The influence of the hot ethanol-water soluble fraction of dried bracken rhizome (bracken extracts) on the Na-K-activated ATPase activity in the rabbit erythrocyte ghosts was investigated. Also the studies on the relationship between amino acids-activation and the bracken extracts-inhibition on the Na-K-ATPase were performed. The results obtained were as follows :

1. The activity of Na-K-ATPase in the red cell ghosts was inhibited by the bracken extracts. And the degree of inhibition in the  $4 \times 10^{-4} g\%$  and  $8 \times 10^{-4} g\%$  concentration of bracken extracts were significant ( $p < 0.05$ )
2. The activation of Na-dependent ATPase activity was inhibited by the  $4 \times 10^{-4} g\%$  of bracken extracts when the sodium concentration was increased gradually and the concentration of potassium was maintained constantly in the working medium.
3. The activation of K-dependent ATPase activity was inhibited by the bracken extracts when the potassium concentration was increased gradually and the concentration of sodium was maintained constantly in the working medium.
4. The activation of Ca-dependent ATPase activity was inhibited by the bracken extracts when the calcium concentration was increased gradually and the sodium and potassium concentration was maintained constantly in the working medium.
5. The activation of Na-K-ATPase was produced when the amino acids containing a typical active

group (NH<sub>2</sub> of lysine, OH of threonine and imidazole of histidine) were added in the working medium. The bracken extracts did not inhibit those amino acids-activation of Na-K-ATPase.

6. The bracken extracts produced remarkable inhibition on the Na-K-ATPase activity which was stimulated by a typical SH group of cysteine, when they were simultaneously added in the working medium.

## 序 論

細胞膜은 그 構造와 酵素들의 特性이 複雜하기 때문에 이온이나 기타 物質들이 細胞膜을 通하여 移動하는 機構은 生理學, 藥理學 및 生化學的인 面에서 重要한 意義를 갖고 있다.

Na 이온과 K 이온이 電氣化學的 濃度傾斜에 逆行하여 移動하는 作用, 卽 이들 陽이온의 pump 作用은 細胞內에서 解糖作用으로 形成된 adenosine triphosphate (ATP)가 分解될 때 생기는 energy 를 利用하고 있다는 것은 잘 알려진 事實이다. (Caldwell 과 Keynes, 1957, Danowski, 1941).

이러한 이온의 能動的 運搬은 사람의 赤血球에서 例를 들면 한 分子의 ATP가 分解될 때 생기는 energy 로 3개의 Na 이온을 細胞膜 밖으로, 2개의 K 이온을 細胞膜 안으로 運搬하고 있다고 한다 (Sen 과 Post, 1964, Whittam 과 Ager, 1965).

Skou (1957) 는 제 (*carcius maenas*)의 末梢神經에서 Mg<sup>2+</sup>를 必學的인 基質로 하고 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>을 同時에 添加할 때 活性化되는 adenosine triphosphatase (ATPase, ATP phosphohydrolase)가 있다는 것을 發見하였고. 이 酵素가 細胞膜에서 이온이 能動的으로 運搬되는 作用과 關係가 있다는 것을 暗示한다고 하였다.

그후에 Mg<sup>2+</sup>-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated ATPase (Skou, 1962) 혹은 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated ATPase (Ahmed 및 Thomas, 1971, Ahmed et al, 1971, Albers 와 Koval, 1972, 1973)가 赤血球膜을 비롯해서 生體의 各種 組織細胞에서 確認되었고, 이 酵素가 Na 이온과 K 이온 等の 能動的 運搬과 密接한 關係가 있다는 것이 여러 研究者들 (Alber 와 Koval, 1973, Dunham 과 Glynn, 1961, Post 및 Jolly, 1957,

Spater et al, 1958, Whittam 과 Ager, 1965)에 의해서 밝혀짐에 따라 強心劑인 digitalis 配糖體는 心筋細胞의 ATPase 活性度를 抑制함으로써 心筋이 inotropic contraction을 일으키게 된다는 등 (Okita et al, 1973) Na-K-ATPase 活性度에 의해서 藥物 및 毒物物質의 藥理學的 作用機構을 究明하려는 努力이 活潑하게 傾注되었다 (Aker, 1971, Lee 와 Klaus, 1971, 高, 1976, 1977, 鄭等, 1976).

한편, 고사리 (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*)는 濟州島에 있어서 畜牛에 對한 가장 危險한 有毒植物이다 (梁, 1978). 英國의 Storrar (1893)가 畜牛의 고사리中毒症 發生例를 처음으로 報告한 以來 Evans (1954~1968)를 爲始한 여러나라의 學者들 (Carpenter et al, 1950, Heath, 1958, Yamane et al, 1975, Yoshihira et al, 1978, Fukuoka, 1982)에 의해서 中毒의 原因物質, 動物種類에 따르는 中毒症狀의 差異 및 治療方法 等に 對한 研究가 遂行되어 왔다.

濟州島는 放牧을 爲主로 하고 있고 또한 他道와는 달리 고사리가 自然草地에서 優占草種中の 하나이기 때문에 中毒發生의 危險性을 恒時 內包하고 있는 實情으로서, 1974年 5月 濟州道 畜産 振興施策의 一環으로서 새로 造成中에 있던 牧場의 Angus 種 肉牛 20頭가 고사리中毒으로 斃死되었고 (金等, 1976), 梁等(1981)에 依하면 道內 19個牧場 2,396頭의 畜牛中 1979年부터 1980年 2個年에 걸쳐 15.2%에 該當하는 364頭가 고사리中毒 症狀을 나타내었고 其中 159頭가 斃死된 것으로 調査 報告되었다. 따라서 濟州道에 있어서 畜牛의 고사리中毒症은 傳染病에 對應할만한 主要 疾患中の 하나인 것이다.

고사리에 依한 中毒症狀은 動物에 따라 差異를

나타낸다. 馬와 쥐에서는 thiamine 欠乏을 主症으로 하고 特히 쥐와 사람에서는 腸癌을 誘發하기도 한다 (Evans, 1968, 禹와 韓, 1975). 그러나 畜牛에 있어서는 反芻胃內의 微生物群에 依해서 thiamine이 合成되기 때문에 thiamine 欠乏症은 問題視되지 않으나, 骨髓의 損傷으로 因한 再生不良性 貧血, 赤血球, 白血球 및 血小板의 減少, 血液凝固 不良, 內部臟器의 出血, 胃腸管粘膜의 出血 및 壞死 等を 主症으로 하는 特異한 中毒症狀를 나타내며 豫後도 不良하다 (Evans et al, 1954, 1959, 1962, 1964, Heath 및 Wood, 1958, Osebold, 1951, Yamane et al, 1975, 北原等, 1968, 1969, 中村, 1968, 土倉等, 1972, 梅田等, 1963, 山根等, 1975).

고사리의 毒物質에 對해서는 thiaminase 혹은 polyphenol antithiamine factor (Evans, 1959, Yoshihira et al, 1978), isothiocyanate系 配糖體와 類似한 物質 (藤田等, 1973, 藤田와 多田, 1973), 發癌物質로서 分子量 156의  $C_7H_8O_4$ 의 分子式을 갖는 carboxylic acid系 化合物이라는 報告도 있으며 (藤村, 1970, 岩田, 1972, 1974), Heparin 樣物質이라는 學者 (Yamane et al, 1975)도 있다. 近年에는 Yoshihira et al (1978) 및 Fukuoka(1982)에 依해서 1-indanone 核을 갖고 있는 20余種의 物質 (pterosins 라고 命名했음)과 그의 配糖體인 數種의 pterosides가 分離되어 이들 物質들이 고사리中毒의 原因物質 및 發癌物質이라는 報告가 가장 認定을 받고 있는 最近의 業績이다. 이러한 고사리의 有毒成分은 熱에 安定하고 alcohol과 물에 溶解되어 抽出된다고 한다 (Evans et al, 1959, 藤村, 1970, 岩田, 1972, 1974, Yoshihira et al, 1978).

그리고, 貧血이나 血球의 減少症, 血液凝固不全症 等を 일으키는 原因中에는 ATPase 活性度の 低下가 關聯되기도 한다 (Ellory 및 Tucker, 1970, Harvald et al, 1964, Levine, 1975, Young, 1975, 金, 1978). 그러나 이러한 症狀은 고사리中毒症의 主要 症狀임에도 不拘하고 고사리의 有害成分이 生體細胞의 ATPase 活性도에 어떠한 作用을 하는가에 對한 研究報告는 아직 없다.

따라서 本實驗은 고사리根莖의 hot ethanol-water soluble fraction을 만들어 이 抽出物이 家兔 赤血球膜分劃의 Na-K-ATPase 活性도에 對한 作用을 究明하고 이것이 고사리中毒과 어떠한 關聯性을 갖고 있는가를 알아보기 위해 實施하였다.

## 材料 및 方法

供試家兔: 高麗大學校 醫科大學 實驗動物 飼育場에서 分讓받은 體重 2kg 內외의 成熟한 白色 家兔를 性的 區別없이 使用하였다.

Hot ethanol-water soluble fraction의 製造: 7月中에 濟州島에서 自生하는 고사리의 地下根莖을 採取하여 3日間 風乾한 後 細切하여 300g 당 1ℓ의 無水 ethanol에 沈漬하고 還流冷却裝置를 附着한 恒溫水槽內에서 76~78℃로 4時間 加溫하여 이를 다시 冷却시킨 뒤 濾過한 것을 증발접시에서 같은 溫度로 再次 加溫하면서 ethanol을 全部 蒸發시켜 暗褐色의 流動性 抽出物을 얻었다. 實驗에 使用하기 前에 抽出物 2g을 取하고 여기에 200 ml가 되도록 蒸溜水를 加하여 80~85℃의 恒溫水槽에서 加溫 溶解한 後 濾過하였다. 濾過되지 않는 殘物의 무게를 秤量해서 (0.4g) 濾過된 抽出物의 含量이  $8 \times 10^{-3} g\%$ 가 되도록 하였다 (hot ethanol-water soluble fraction (pH 4.0)). 이것을 다시 倍數씩으로 稀釋한  $8 \times 10^{-3}$ ,  $4 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-3} g\%$ 의 溶液을 各各 實驗에 使用하였다.

赤血球膜分劃 (RBC ghost)의 製造法: RBC ghost의 製造는 Dunham과 Glynn (1961)의 方法에 依하여 實施하였다.

Heparin으로 凝固를 防止하면서 家兔의 頸動脈에서 採血한 血液을 centrifuge (Beckman J-21型)를 利用하여 1,000×g로 15分間 遠心分離한 後 血漿과 RBC上層의 buffy coat를 除去하였다. 이를 生理的 食鹽水로 1,000×g에서 15分씩 2回 洗滌하고 다시 等張性  $MgCl_2$  溶液에 1mM EDTA를 含有한 溶液으로 2回 洗滌하였다. 이렇게 洗

**Table 1. Arrangement of the operating test tubes and working solutions.**  
(Case of influence of bracken extract concentrations on Na-K-ATPase activity)

working solutions	test tubes					
	1	2	3	4	5	6
0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.6)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
20mM MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
800 mM NaCl	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
170 mM KCl	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RBC ghost	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Extracts						
1 × 10 <sup>-3</sup> g%	-	-	0.1	-	-	-
2 × 10 <sup>-3</sup> g%	-	-	-	0.1	-	-
4 × 10 <sup>-3</sup> g%	-	-	-	-	0.1	-
8 × 10 <sup>-3</sup> g%	-	-	-	-	-	0.1
15 mM ATP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Distilled water	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2

滌된 赤血球만을 모아 hemoglobin-free ghost를 얻기 위하여 Rosenberg 및 Guidotti (1968)의 방법에 따라 30 배 용량의 15 mOsm Tris-HCl buffer液 (pH 7.6)을 加하여 4°C에서 1時間 동안 放置하였다. 이렇게 하여 溶血된 赤血球를 4°C에서 10,000 × g로 15分間 遠心分離하고 上澄液을 除去하여 膜分劃만을 얻었다. 이것을 다시 15 mOsm Tris-HCl buffer液에 1 mM EDTA를 混合한 溶液으로 2回 遠心分離하여 洗滌하고나서 15 mOsm Tris-HCl buffer液으로 1回 洗滌하여 血色素의 附着이 없는 乳白色의 膜分劃(ghost)을 얻어 本實驗에 使用하였다.

ATPase의 活性度 測定: ATPase의 活性度は Dunham과 Glynn (1961), 高(1976, 1977)의 方法에 依하여 測定하였다. 10 ml 容量의 6個 試驗管內에 0.2 M Tris-HCl buffer液 (pH 7.6) 0.2 ml씩을 取하여 여기에 膜分劃과 여러 反應液을 各各 0.1 ml씩 添加하고 蒸溜水로 總量이 1 ml가 되도록 調節하여 44°C에서 한 時間 동안 shaking water bath에서 反應시켰다 (表1 參照). 15 mM

ATP를 加할 때와 water bath에 넣고 꺼낼 때는 모두 一定한 時間 間隔으로 行하여 反應時間을 一定하게 하였다.

1時間 동안 反應시킨 試驗管들을 얼음으로 冷却시킨 冷却水에 옮기고 여기에 冷却된 10% TCA液 1 ml씩을 같은 時間 間隔으로 添加하여 反應을 停止시킨 다음 15分間 1,000 × g로 遠心分離하였으며, 그 上澄液 1.5 ml를 取하여 Fiske-Subbarow法 (1925)에 依해서 遊離된 無機磷酸鹽(ATP → ADP + Pi<sup>†</sup>)을 比色計(Coleman spectronic 20)로 測定하였다. 比色計에 나타난 O.D. 值를 標準曲線(表2)에 依하여 mM Pi/l, packed ghosts/hr.로 表示하여 이것을 ATPase 活性度로서 나타내었으며 各 實驗區는 5回 反復으로 實施하였다.

本實驗에서 使用한 蒸溜水는 雜物質을 除去한 것을 使用하였으며, 그밖의 試案은 다음과 같다.

Heparin (Liker 製), Tris, EDTA, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, Ethanol (99.8%), L-Threonine, L-Cysteine, L-Lysine (以上 Merck 製), Aminonaphtol sulfonic acid, L-Histidine (以上 Kishida 製), HCl, KCl,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ammonium molybdate (以上 Wako 製), TCA (Yoneyama 製), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Showa 製), Sodium sulfite (Nippon Shiyaku 製), ATP (Sigma 製).

Table 2. Measurement of standard curve of inorganic phosphate.

1mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Standard sol. (ml)	Distilled water (ml)	2% Ammonium molybdate (ml)	Reducing reagent* (ml)
Test cuvette			
No.			
1	0.2	8.3	1.0
2	0.5	8.0	1.0
3	1.5	7.0	1.0
4	2.0	6.5	1.0
Blank cuvette			
	0	8.5	1.0

\* Reducing reagent: 0.25 g of Aminonaphthol sulfonic acid and 0.5 g of Sodium sulfite in 100 ml of D.W.

## 結 果

### 1. Na-K-ATPase 活性도에 對한 고사리抽出物 濃도의 影響

反應液內의 고사리抽出物의 濃도를 0에서 8×10<sup>-4</sup> g%까지 增加시킬 때 나타나는 Na-K-ATPase의 活性도는 圖1에서 보는 바와 같다. 即 濃도의 增加에 따라 ATPase 活性도는 强하게 抑制되며, 4×10<sup>-4</sup> g% 以上에서는 抑制力이 漸次 鈍化되는 傾向을 보였다. 그리고 4×10<sup>-4</sup> 및 8×10<sup>-4</sup> g% 濃도의 고사리抽出物이 Na-K-ATPase 活性도를 抑制하는 作用은 統計적으로 有意性이 있었다 (P < 0.05).

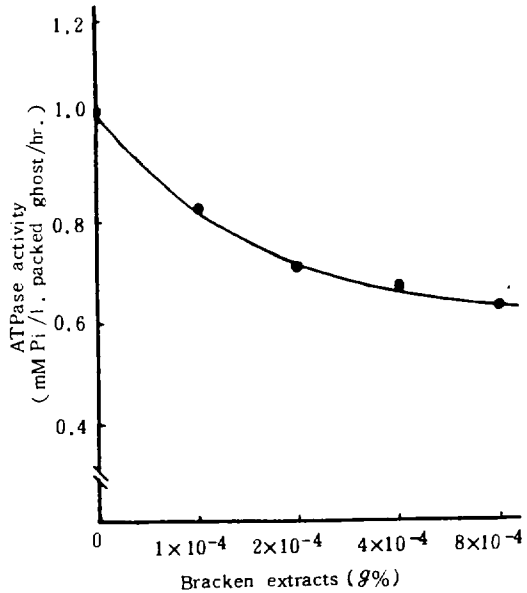


Fig.1. The effect of hot ethanol-water soluble extracts concentration of bracken rhizome on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM, duration 1 hr.

### 2. Na 이온의 濃도에 依한 影響

反應液內의 K 이온의 濃도를 17 mM로 一定하게 維持하고, Na 이온의 濃도를 0에서 120 mM 까지 變動시켰을 때 ATPase 活性도의 變化는 圖2와 같다. 即 Na 이온의 濃도를 漸次 增加시킬 때 나타나는 ATPase 活性도의 變動은 80 mM까지는 漸次的으로 增加하는 傾向을 보이나 그 以上の 濃도에서는 有意하게 增加되지 않았다.

그리고 反應液內의 K 이온의 濃도를 17 mM로 一定하게 維持하면서 고사리抽出物 (4×10<sup>-4</sup> g%)을 追加한 後 Na 이온의 濃도를 段階적으로 增加시켰을 경우 ATPase의 活性도를 測定하였다. 이 때 ATPase의 活性도는 Na 이온의 濃도 增加에 依하여 거의 影響을 받지 않았다 (圖2). 即 고사리抽出物은 Na 이온의 濃도 增加에 따르는 ATPase 活性도의 增加를 抑制하였다.

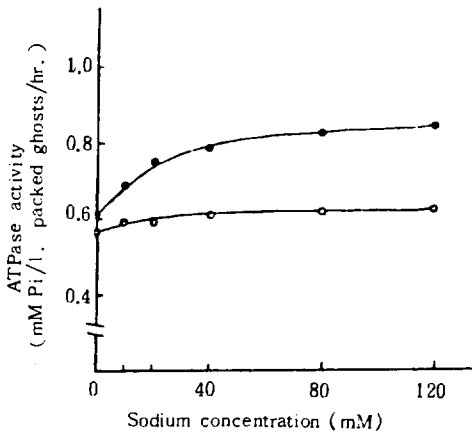


Fig. 2. The effect of sodium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of bracken extracts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; K 17 mM. Duration 1 hr. ●—● Bracken extracts absent, ○—○ Bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

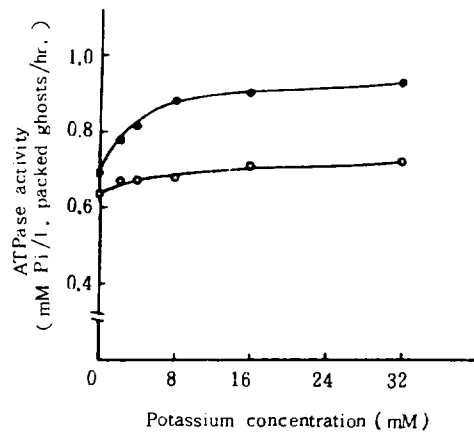


Fig. 3. The effect of potassium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of bracken extracts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM. Duration 1 hr. ●—● Bracken extracts absent, ○—○ Bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

### 3. K이온의 농도에 의한影響

反應液內의 Na이온의濃度を 80 mM로 一定하게 維持하고 K이온의濃度を 0에서 32 mM까지 變動시키면서 ATPase 活性度の變化와 一定濃度の 고사리抽出物 ( $4 \times 10^{-4}$  g%)을 追加했을 때의 ATPase 活性度の變動은 圖 3과 같다. 即 K이온의濃度を 漸次 增加시켰을 때에 나타나는 ATPase의 活性도는 16 mM까지는 漸次的으로 增加되었으나 그 以上の濃度에서는 有意하게 增加되지 않았다. 그리고 고사리抽出物을 追加하였을 때 ATPase 活性도는 K이온의濃度を 增加시켰을 때 따라 多少 增加하는 傾向을 보였으나 統計적으로는 거의 一定하였다 (圖 3). 即 고사리抽出物은 K이온의濃度 增加에 依한 ATPase 活性度の

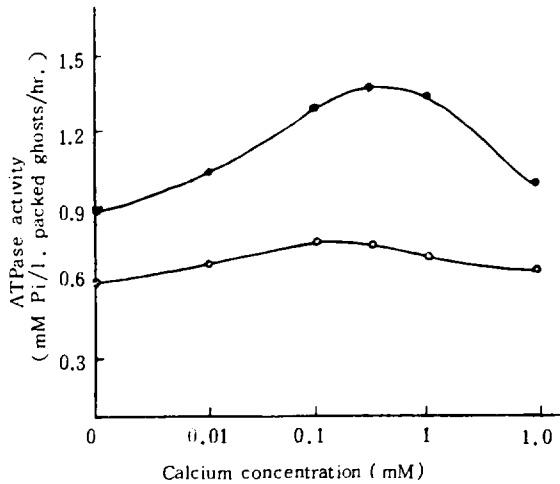
增加를 抑制하였다.

### 4. Ca이온의 농도에 따르는影響

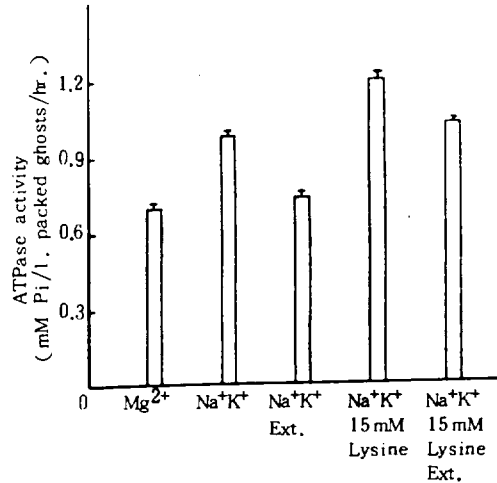
Na이온과 K이온의濃度を 各各 80 및 70 mM로 一定하게 維持하면서 Ca이온의濃度を 0에서 10 mM까지 變動시켰을 때 Na-K-ATPase의 活性도에 미치는影響과 여기에 고사리抽出物 ( $4 \times 10^{-4}$  g%)을 追加하였을 때의 活性度の變化는 圖 4와 같다. 即 Ca이온의濃度を 0.5 mM까지 增加시켰을 때 나타나는 Na-K-ATPase의 活性도는 漸次 增加하였으나 그 以上の濃度에서는 오히려 漸次 抑制되었다.

그리고 Ca이온의濃度を 變動시켰을 때의  $Ca^{++}$  dependent -Na-K-ATPase의 活性도는 고사리抽出物

에 依해서 有意하게 抑制되었다.



**Fig. 4.** The effect of calcium concentration on the ATPase activity of red cell ghosts in the presence and absence of bracken extracts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM. Duration 1hr. ● Bracken extracts absent, ○ Bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.



**Fig. 5.** The effect of lysine in the presence of bracken extracts on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; lysine 15mM. Duration 1hr. Ext: bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

### 5. Lysine의 作用에 對한 고사리 抽出物의 影響

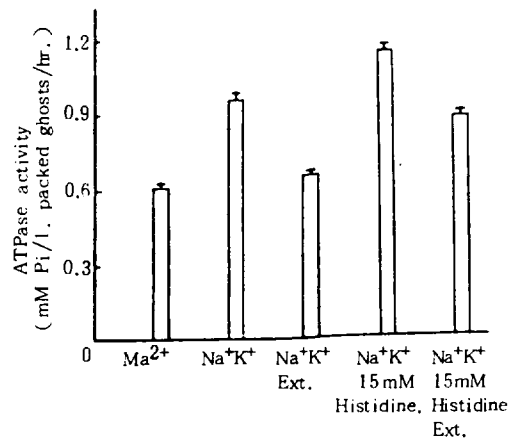
고사리抽出物이 Lysine의 Na-K-ATPase 活性度 增加作用에 미치는 影響은 圖 5와 같다.

Lysine을 添加하였을 때 나타나는 Na-K-ATPase 活性도는 Lysine을 加하지 않았을 때보다 多少 增加하였다. 그리고 Lysine으로 前處置한 다음 고사리抽出物을 追加했을 때 ATPase의 活性도는 減少하였으나 統計的인 有意性은 없었다.

### 6. Histidine의 作用에 對한 고사리抽出物의 影響

고사리抽出物이 Histidine의 Na-K-ATPase 活性度 增加作用에 미치는 影響은 圖 6과 같다.

Na-K-ATPase 活性도는 Histidine에 依하여 多少 增加하였다. 고사리抽出物을 Histidine으로 前



**Fig. 6.** The effect of histidine in the presence of bracken extracts on the ATPase activity of red cell ghosts. Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5mM; Mg 2mM; Na 80mM; K 17mM; histidine 15mM. Duration 1hr. Ext: bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

處置한 反應液內에 追加하였을 때 ATPase의 活性度는 減少하였다. 그러나 Histidine의 增加作用에 對한 고사리抽出物の 抑制作用은 統計적으로 有意性이 없었다.

### 7. Threonine의 作用에 對한 고사리抽出物の 影響

Na-K-ATPase 活性度에 對한 Threonine의 影響과 고사리抽出物이 Threonine의 作用에 미치는 影響은 圖7에서 보는 바와 같다. Lysine 및 Histidine의 作用과 마찬가지로 Threonine도 Na-K-ATPase 活性度を 增加시켰으며, 고사리抽出物은 Threonine의 이러한 活性度 增加作用을 完全히 抑制하지는 못하였다.

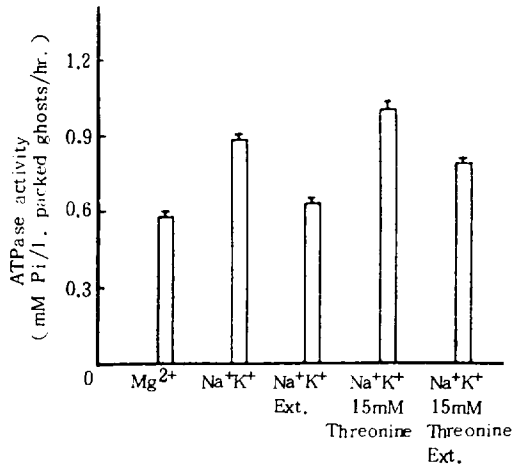


Fig.7. The effect of threonine in the presence of bracken extracts on the ATPase activity of red cell ghosts.

Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; threonine 15 mM. Duration 1 hr.  
Ext: bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

### 8. Cysteine의 作用에 對한 고사리抽出物の 影響

Na-K-ATPase 活性度에 對한 Cysteine의 作用과 이에 대한 고사리抽出物の 影響은 圖8과 같다.

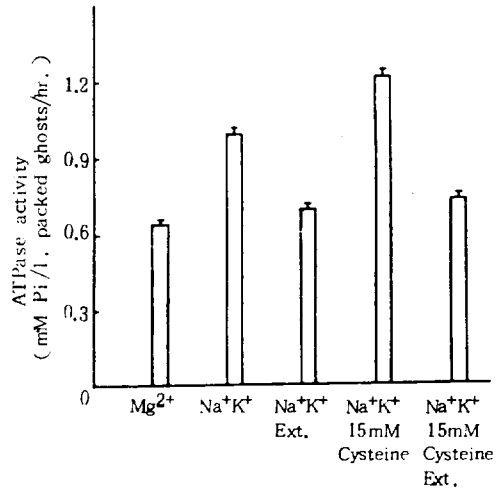


Fig.8. The effect of Cysteine in the presence of bracken extracts on the ATPase activity of red cell ghosts.

Temp. 44°C; pH 7.6; ATP 1.5 mM; Mg 2 mM; Na 80 mM; K 17 mM; Cysteine 15 mM; Duration 1 hr.  
Ext: bracken extracts  $4 \times 10^{-4}$  g%.

Cysteine도 마찬가지로 Na-K-ATPase 活性度を 上昇시켰다. 그러나 이러한 Cysteine의 ATPase 活性度を 上昇시키는 補充作用은 고사리抽出物에 依해서 有意하게 抑制되었다.

## 考 察

사람의 赤血球膜 (Danowski, 1941, Sen 및 Post, 1964, Whittam과 Ager, 1965)을 비롯하여 腦 (Ahmed 및 Thomas, 1971, Ahmed et al, 1971, Albers 및 Koval, 1972, Blostein, 1968), 肝 (Cahri-Bitron 및 Bino, 1971, Essner et al, 1958), 細尿管 (Spater et al, 1958), 心筋 (Kennedy 및 Weer, 1977), 오징어의 巨大神經 軸索突起 (Borting과 Caravaggio, 1962, Caldwell 및 Keynes, 1957), 계의 神經 (Skou, 1957), 電氣 膜 障어의 發電器官



(Albers 및 Koval, 1973) 등에서分離되는 ATPase는 그 量的인 差異는 있으나 根本的으로는 細胞膜에서 이루어지는 이온의 能動的인 運搬과 密接한 關係가 있다는 事實이 여러 研究者들 (Lee와 Klaus, 1971, Schwartz et al, 1975, Skou, 1962)에 依하여 究明되어 있다.

또한 家兔의 赤血球膜을 利用하여 여러가지 藥物이 Na-K-ATPase 活性도에 미치는 影響을 報告한 例는 많다 (高, 1976, 1977, 鄭等, 1976).

本 實驗에서는 家兔 赤血球膜을 利用하여 고사리 乾燥根莖의 抽出物 (hot ethanol-water soluble fraction)이 Na-K-ATPase의 活性도에 미치는 影響을 觀察하였다.

ATPase의 活性도를 增進시키는 物質로서는  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  등의 陽이온을 비롯하여 amino acids, 人蔘, aconite, serotonin, pilocarpine, catecholamines 등이 있고 (Schwartz et al, 1975, 姜 및 高, 1974, 高, 1976, 1977, 鄭等, 1976), 抑制하는 것으로서는 anthraquinone, digitalis, strophanthin-G, promethazine, chlorpromazine, diphenhydramine, quinine, 水銀利尿劑,  $H_2O$ , diphenylhydantoin, oligomycin, ethanol 등이 있다 (Judah 및 Ahmed, 1964, Lee와 Klaus, 1971, Schwartz et al, 1975, 高, 1977).

또한 濃도에 따라 增進 또는 抑制하는  $Ca^{2+}$  (Dunham 및 Glynn, 1961), Ouabain (Schwartz et al, 1975) 과 어떤 物質이 存在하느냐에 따라서 作用이 다르게 나타나는 hydroxylamin (Bader 및 Broom, 1967) 등도 있다.

ATPase 活性도는 水素이온 濃도에 依해서도 影響을 받는다. pH가 너무 높거나 낮은 데서는 抑制되므로 最適 pH인 7~8 (Dunham 및 Glynn, 1961)로 維持하기 위하여 pH 7.6인 緩衝液을 實驗에 使用하였다. 그리고 添加되는 陽이온들의 濃도에 依하여 影響을 받으므로 最適濃도를 本實驗에 利用하였고 反應溫度는 44°C를 維持하였다.

Whittam (1962), Whittam 및 Ager (1965), Schwartz et al (1975)는  $Na^+$  과  $K^+$ 에 依하여 活性化되는 Na-K-ATPase가 細胞膜 內側에  $Na^+$  이온과 親和性이 있는 反應部位과 細胞膜 外側에  $K^+$  이온과 親和性이 있는 反應部位가 있다고 提示하였다. 赤

血球膜分劃 (RBC ghost)은 이들 이온에 對한 透過性이 높으므로 이들 이온들은 反應液內에서 쉽게 親和性을 가진 部位와 作用하게 될 것으로 생각된다. 그런데 Skou (1957, 1962)의 實驗에서는  $Mg^{2+}$ 가 ATPase의 反應部位에 結合될 때 비로소 이 酵素가 活性化되며 여기에  $Na^+$  과  $K^+$ 가 追加되면 一層 더 活性化된다고 하였다.

Okita et al (1973), Schwartz et al (1975)에 依하면 ATPase에는 各種 이온에 對한 各各의 反應部位가 있다고 提案하였고, 高 (1976, 1977)에 依하면 이 酵素에는  $NH_2$ , OH, imidazole, SH基의 反應部位가 있고 이 活性基에 依하여 Na-K-ATPase는 加一層 活性化된다고 報告하였다.

本 實驗에서 고사리抽出物은 Na-K-ATPase 活性도를 顯著하게 抑制하였다. 其中에서도  $4 \times 10^{-4}$  및  $8 \times 10^{-4} g\%$  濃度の 抑制作用은 有意성이 認定되었으므로 ( $P < 0.05$ ) 낮은 濃度の  $4 \times 10^{-4} g\%$ 를 고사리抽出物의 實驗濃도로 定하였다.

反應液內의  $Na^+$  이온과  $K^+$  이온의 濃도를 增加시키면서 Na-K-ATPase 活性도를 調査한 結果,  $Na^+$  이온이나  $K^+$  이온을 낮은 濃度에서 漸次 增加시켜 감에 따라 Na-K-ATPase 活性도가 急激히 上昇하였다. 이것은 이들 이온들이 아직 置換되거나 占有되지 않은 親和性이 있는 反應部位에 容易하게 作用하여 ATPase가 急激히 活性化되며 또한 濃도가 어느정도 增量됨에 따라 別다른 障礙를 받지 않고 ATPase의 活性도는 上昇되나, 높은 濃度에서는 이들 이온들의 反應部位가 飽和狀態가 되어 더 이상 上昇되지 못하는 것으로 思料된다.

이때 고사리抽出物을 添加하면 抽出物中의 어떤 物質이 이들 이온의 反應部位에 作用하여 ATPase 活性도를 抑制하게 되는 것으로 推定된다.

그리고 고사리抽出物은  $Ca^{2+}$  이온의 濃度 增加에 따르는  $Ca^{2+}$  dependent-Na-K-ATPase 活性도의 增加作用을 顯著하게 抑制하였다. 이러한 傾向으로 봐서 고사리抽出物中의 어떤 物質은  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  이온들과 親和性이 있는 反應部位에 作用하여 이들 이온에 依해서 活性化되는 ATPase 活性도를 抑制하고 있다는 것을 暗示하고 있다.

反應液을 Lysine, Threonine, Histidine 등으로

前處置한 다음 고사리抽出物을 作用시키면 Na-K-ATPase 活性도는 多少 減少되었으나 이들 아미노 酸에 의하여 增加된 Na-K-ATPase 活性도는 抑制 하지 못하였다. 이 事實로 미루어보아 Lysine의 NH<sub>2</sub> 基, Threonine의 OH 基, Histidine의 imidazole 基 등의 活性基에 의하여 活性化되는 ATPase의 反應部位에 고사리抽出物은 抑制的으로 作用하지 못하고 있다는 것을 뜻한다.

그러나, Cysteine을 前處置한 實驗區에서는 고 사리抽出物이 Cysteine의 增加作用을 顯著하게 抑制하였다. 이것은 Cysteine의 SH 基와 고사리抽出物의 Na-K-ATPase 活性도의 抑制作用과는 깊은 聯關性을 갖고 있는 것으로 생각되는데 Cysteine의 活性基인 SH 基에 依해서 活性化되는 ATPase의 反應部位에 고사리抽出物이 作用해서 그 活性도를 抑制하고 있다는 것을 뜻한다.

이러한 고사리의 Na-K-ATPase 活性도를 抑制 하는 作用은 高(1977)가 實驗한 anthraquinone의 作用과 비슷한 結果를 얻었다. 勿論 本實驗이 in vivo 實驗이 아니고 또한 고사리抽出物도 有毒成分만을 純粹分離하여 使用한 것이 아니기 때문에 確定的으로 斷言할 수는 없으나, 本 實驗을 通하여 고사리抽出物이 Na-K-ATPase, Na-ATPase, K-ATPase, Ca dependent-Na-K-ATPase 등의 活性도를 모두 抑制할 뿐 아니라 SH 基에 依해서 活性化되는 Na-K-ATPase를 抑制하는 作用은 여러 가지 問題를 提示하고 있다.

藤田 및 多田羅(1973)는 少量의 고사리 水中抽出物을 注射한 마우스群이 가벼운 症狀를 나타낸 다음 즉시 回復하였는데 이것은 體內에 保有하고 있는 SH 基에 依해서 解毒된 結果라고 推定하였다.

SH 基가 고사리의 有毒成分을 解毒하는 것과 關係가 있다고 한다면 本實驗에서처럼 고사리의 有毒成分에 依해서 SH 基의 活性는 漸次 抑制되어 毒成分은 體內에서 徐徐히 蓄積되어 發症의 閾值에 達하였을 때 症狀가 나타나는 慢性型 中毒이라고 推定할 수 있다.

또한 貧血 및 血液障害에 ATPase 活性도의 低下가 關聯된다고 하며(Ellory 및 Tucker, 1970, Harvald 등, 1964, Williams, 1972, 藤田 등, 1973,

金 1978) 특히 血球의 減少症과 ATPase 活性도의 低下와는 깊은 關係가 있으므로 赤血球 減少現象은 貧血과 體內 酸素의 欠乏을 招來하고, 白血球의 減少로 體內 防禦機轉의 弱화, 또한 血小板의 減少는 血液凝固를 지연시키는 機轉中의 하나 이기 때문에(Levine, 1975, 山根 등, 1975, 金, 1978) 이러한 血液不良症 등 고사리에 依한 中毒 症狀는 고사리의 여러가지 有毒成分들 中 ATPase의 活性도를 低下시키는 因子도 相當한 作用을 하고 있다고 생각된다.

## 摘 要

Na 이온과 K 이온에 依해서 活性化되는 細胞內의 Na-K-ATPase 活性도에 對한 고사리抽出物의 作用을 觀察하기 爲하여 家兔 赤血球의 膜分割(R-BC ghost)을 만들어 7月中에 自生하고 있는 고사리의 乾燥根莖에서 hot ethanol-water soluble fraction을 分離하여 이 抽出物이 RBC ghost의 Na-K-ATPase 活性도에 對한 作用을 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 고사리根莖의 hot ethanol-water fraction은 Na-K-ATPase의 活性도를 顯著히 抑制하는 作用이 있다. 그리고  $4 \times 10^{-4} g\%$  및  $8 \times 10^{-4} g\%$  濃度の 抑制作用은 統計的으로 有意성이 認定되었다 ( $P < 0.05$ ).
2. 고사리抽出物은 Na 이온의 濃度 增量에 依한 Na-K-ATPase 活性도의 增加를 抑制하였다.
3. 고사리抽出物은 K 이온 濃度の 增加에 依한 Na-K-ATPase 活性도의 增加를 抑制하였다.
4. Ca 이온의 濃度 增加에 따르는 Ca dependent-Na-K-ATPase 活性도의 增加도 고사리抽出物에 依해서 抑制되었다.
5. 고사리抽出物은 NH<sub>2</sub>, OH, imidazole 基에 依해서 活性化되는 Na-K-ATPase의 反應部位에 作用하지 않았다.
6. SH 基에 依해서 活性化되는 Na-K-ATPase의 反應部位에 對해서 고사리抽出物은 抑制的으로 作用하였다.

## 謝 辭

本研究를 遂行함에 있어 有益한 助言을 해주신 서울大學校 獸醫科大學 韓壽南 教授님, 그리고 研究에 便宜를 提供해 주신 高麗大學校 醫大 藥理學 教室 申萬鍊 教授님과 教室員 여러분께 感謝의 뜻을 表합니다.

## 引用文獻

- Ahmed, K. and Thomas, B.S. (1971). The effects of Long Chain fatty acids on sodium plus potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 246, 103-109.
- Ahmed, K., Riggs, C. and Ishida, H. (1971). The effects of  $2H_2O$  on sodium plus potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 246, 6197-6203.
- Albers, W. and Koval, G.J. (1972). Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. VII. Concurrent inhibition of  $Na^+K^+$ -adenosine triphosphatase and activation of  $K^+$ -nitrophenylphosphatase activities. *J. Biol. Chem.*, 247, 3088-3092.
- Albers, R.W. and Koval, G.J. (1973). Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of *Electrophorus electric organ*. *J. Biol. Chem.*, 248, 777-784.
- Akera, T., Brody, T.M. and Leeling, N. (1971). Insecticide inhibition of Na-K-ATPase activity. *Biochem. Pharm.*, 20, 471-472.
- Bader, H. and Broom, A.H. (1967).  $Ca^{2+}$ -dependent inhibition of ( $Na^+K^+$ )-dependent ATPase by hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 517-519.
- Blostein, R. (1968). Relationship between erythrocyte membrane phosphorylation and adenosine triphosphate hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 213, 1957-1965.
- Bonting, S.L. and Caravaggio, L.L. (1962). Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the squid giant axon. *Nature*, 194, 1180-1181.
- Caldwell, P.C. and Keynes, R.D. (1957). The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion from giant axons. *J. Physiol.*, 137, 12-13.
- Carpenter, K.J., Phillipson, A.T. and Thomson, W. (1950). Experiments with dried bracken (*Pteris aquilina*). *Brit. Ver. J.*, 106, 292-308.
- Cabri-Bitron, A. and Bino, T. (1971). Effect of 1-tetrahydrocannabinol on ATPase activity of rat liver mitochondria. *Biochem. Pharm.*, 20, 473-475.
- Danowski, T.S. (1941). The transfer of potassium across the human blood cell membrane. *J. Biol. Chem.*, 139, 693-705.
- Dunham, E.T. and Clynn, I.M. (1961). Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J. Physiol.*, 156, 274-293.
- Ellory, J.C. and Tucker, E.M. (1970). Active potassium transport in the immature red cells of anaemic sheep. *J. Physiol.*, 208, 18-19.
- Essner, E., Novikoff, A.B. and Masek, B. (1958). Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 711-715.
- Evans, I.A. (1968). The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Research*, 28, 2252-2261.
- Evans, I.A. and Howell, R.M. (1962). Bovine bracken poisoning. *Nature*, 194, 584-585.
- Evans, W.C. (1964). Bracken poisoning of farm animals. *Vet. Rec.*, 76, 365-369.

- Evans, W.C., Evans, E.T.R. and Hughes, L.E. (1954). Studies on bracken poisoning in Cattle-Part III. Field outbreaks of bovine bracken poisoning. *Brit. Vet. J.*, 110, 426-442.
- Evans, W.C., Evans, I.A., Chamberlain, A.G. and Thomas, A.J. (1959). Studies on bracken poisoning in cattle. *Brit. Vet. J.*, 115, 83-85.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fukuoka, M. (1982). Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-0-Cafleoyl-shikimic acid as an antithiamine factor. *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 9:3219-3224.
- Harvald, B., Hanel, K.H., Squires, R. and Trap-Jensen, J. (1964). Adenosine-triphosphatase deficiency in patients with non-spherocytic hemolytic anemia. *Lancet*, 2, 18-19.
- Heath, G.B.S. and Wood, B. (1958). Bracken poisoning in Cattle. *J. Comp. Path.*, 68, 201-212.
- Judah, J.D. and Ahmed, K. (1964). Inhibitors of transport and cation activated ATPase. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 64, 355-362.
- Kennedy, B.G. and Weer, P.D. (1977). Relationship between Na:K and Na:Na exchange by the sodium pump of skeletal muscle. *Nature*, 268, 165-167.
- Lee, K.S. and Klaus, W. (1971). The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharm. Rev.*, 23, 193-244.
- Levine, W.G. (1975). Anticoagulant, antithrombotic, and thrombolytic drugs, p. 1364-1365. In L.S. Goodman and A. Gilman (ed). *The pharmacological basis of therapeutics*. Macmillan, N.Y.
- Okita, G.T., Richardson, F. and Roth-Schechter, B.F. (1973). Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium and potassium-Activated adenosine triphosphatase. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 185, 1-11.
- Osebold, J.W. (1951). An approach to the pathogenesis of fern poisoning in the bovine species. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 199, 440-441.
- Post, R.L. and Jolly, P.C. (1957). The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 118-128.
- Rosenberg, S.A. and Guidotti, G. (1968). The protein of human erythrocyte membranes: I. Preparation, solubilization and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, 243, 1985-1992.
- Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C. (1975). The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharm. Rev.*, 27, 3-134.
- Sen, A.K. and Post, R.L. (1964). Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 239, 345-352.
- Skou, J.C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 394-401.
- Skou, J.C. (1962). Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 314-325.
- Spater, H.W., Novikoff, A.B. and Marsek, B. (1958). Adenosinetriphosphatase activity in the cell membranes of kidney tubule cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 765-770.

- Storror, D.M. (1893). Cases of vegetable poisoning in cattle. *J. of comp. Path.*, 6: 276-279.
- Whittam, R. (1962). The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.*, 84, 110-118.
- Whittam, R. and Ager, M.E. (1965). The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocyte. *Biochem. J.*, 97, 214-227.
- Williams, H.E. (1972). Inherited defects in erythrocyte enzymes associated with hemolysis, p.541.  
In K.L. Melmon and H.F. Morrelli (ed). *Clinical pharmacology*. Macmillan, N.Y.
- Yamane, O., Hayashi, T., Sako, S., Kihara, T. and Koyama, M. (1975). Studies on hemorrhagic diathesis of experimental bovine bracken poisoning. I. Detection of circulating anticoagulants. *Jap. J. Vet. Sci.*, 37, 335-340.
- Yamane, O., Hayashi, T., Sako, S., Tatematsu, S., Takeda, K. and Fukushima, H. (1975). Studies on hemorrhagic diathesis of experimental bovine bracken poisoning. II. Heparin-like substance level in blood. *Jap. J. Vet. Sci.*, 37, 341-347.
- Yoshihira, K., Fukuoka, M., Kuroyanaki, M., Natori, S., Umeda, M., Morohoshi, T., Enomoto, M. and Saito, M. (1978). Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. I. Introduction, extraction and fractionation of constituents, and toxicological studies including carcinogenicity tests. *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 8: 2346-2364.
- Young, L.E. (1975). Hemolytic disorders, p. 1434-1435.  
In P.B. Beeson and W. Medermott (ed). *Textbook of Medicine*. Saunders, Philadelphia.
- 藤田孝, 漆原隆雄, 三木敏弘, 岩本研, 多田羅昌 (1973). フラビの有毒成分に関する研究, 毒成分の定性分析上, 獣畜新報, 584, 149-150.
- 藤田孝, 多田羅昌 (1973). フラビの有毒成分に関する研究, マウスによる毒性試験 II, 獣畜新報, 595, 753-754.
- 藤村忠明 (1970). フラビ中毒の原因物質に関する最近の研究通信, 獣畜新報, 532, 24.
- 岩田神之助 (1972). 放牧牛のフラビ中毒について, C. 生化学面から, 獣畜新報, 581, 16-19.
- 岩田神之介 (1974). 放牧牛のフラビ中毒と毒成分の本體, 家畜衛試場年報, 14, 135-138.
- 北原友榮, 福島龍博, 安達秀雄, 中村良一 (1969). 牛のフラビ中毒の實驗的研究, II. 第2ないし第4例の臨床, 血液, 骨髓液の所見, 獣畜新報, 491, 305-311.
- 北原友榮, 山口勝, 福島龍博, 安達秀雄, 中村良一 (1968). 牛のフラビ中毒の實驗的研究, I. フラビ給與試験 第1例, 獣畜新報, 471, 545-552.
- 中村良一 (1968). 牛の汎骨髓癆とフラビ中毒およびその豫防と治療, 畜産の研究, 22, 405-409.
- 土倉道之, 大野芳昭, 三橋一男, 町田外止雄, 澤勝, 原野清文, 堀井源, 永田秀朝 (1972). 放牧牛のフラビ中毒自然發症試験と治療成績, 獣畜新報, 573, 865-867.
- 梅田信良, 渡部克己, 野口節夫, 佐藤竹雄, 齊藤照, 石塚規, 吉田茂登一, 佐藤淳一, 菅原勉, 吉官幸雄 (1963). 牛フラビ中毒に関する實驗的研究, 獣畜新報, 360, 1090-1094.
- 山根乙彦, 林隆敏, 迫悟, 木原保, 小山實, 板垣啓三郎 (1975). 牛の實驗的フラビ中毒症における出血性素因に関する研究, 血液凝固不全について, 日獣會誌, 28, 219-223.
- 姜炳男, 高日燮 (1974). 人蔘이 家兔赤血球膜의 Na, K-ATPase 活性度에 미치는 影響, 大韓生理學誌, 8, 55-65.

- 高日燮 (1976), 家兔赤血球膜의 Na, K-ATPase 의 活性度에 對한 Aconite의 作用, 大韓生理學誌, 10, 15-24.
- 高日燮 (1977), Anthraquinone 가 家兔赤血球膜의 Na, K-ATPase 의 活性度에 對한 作用, 大韓生理學誌, 11, 1-10.
- 高日燮 (1977), Pilocarpine 가 家兔赤血球膜의 Na, K-ATPase 의 活性度에 對한 作用, 大韓生理學誌, 11, 11-20.
- 金東集 (1978), 藥劑로 因한 血液障害, 醫藥情報 (ソウル), 41, 37-41.
- 金五南, 徐斗錫, 林貞澤, 韓邦根, 金弘都, 金泳祐, 金瑩禧 (1976), 고사리中毒牛의 治療試驗, 大韓獸會誌, 12, 177-181.
- 禹源植, 韓龍鳳 (1975), 고사리食品의 發癌性, 韓國生藥研究年報, 14, 1-4.
- 鄭淳東, 林喆斌, 高日燮 (1976), 家兔赤血球膜의 Na, K-ATPase 의 活性度에 對한 Serotonin의 作用, 大韓生理學誌, 10, 25-34.
- 梁奇千 (1978), 濟州道の 有毒植物에 對한 調查研究, 大韓獸醫學會誌, 18, 1:39-50.
- 梁奇千, 金承贊, 張德支 (1981), 濟州道の 導入牛에 있어서 고사리中毒의 發生狀況 및 그 對策에 對한 調查研究, 濟州大學 論文集 12輯 : 133-