HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット及びウサギ脳Na, K-ATPase活性に対するbufadienolidesの作用
Author(s)	鈴木, 邦明; 南川, 元; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 227-233
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68813
Type	journal article
File Information	38_02_13_Li.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　著

ラット及びウサギ脳Na, K-ATPase活性に対するbufadienolidesの作用

李　　加　　鈴木　邦明　　蘇　　韶懿　　南川　　元　　吉村　善隆

抄　録：漢方薬のセンソは約100種類のbufadienolidesを含む．Bufadienolidesは心不全治療薬であるジギタリスなどと同様の強心ステロイドであり，Na, K-ATPase活性の阻害作用を示すが，報告は少ない．本研究は，bufadienolidesのNa, K-ATPaseに対する作用とその機構を明らかにすることを目的に行った．Bufadienolidesとしてbufalin，cinobufagin，cinobufotalin，ジギタリス類としてouabainを使用し，ウサギ及びラット脳から精製したNa,K-ATPase活性に対する作用を検討した．Bufadienolidesとouabainは，ウサギ及びラット脳Na,K-ATPase活性をほぼ完全に阻害した．両Na, K-ATPase活性に対する50 %阻害濃度（IC_{50}）は，ouabainでは290及び260 nM，bufalinでは40及び20 nM，cinobufaginでは230及び90 nM，cinobufotalinでは300及び150 nMであった．ウサギ脳Na, K-ATPaseに対するcinobufotalinを除いて，bufadienolidesはNa, K-ATPaseの特異的阻害薬とされるouabainよりも強い抑制作用を示し，特に，bufalinは強い作用を示した．また，ラット脳Na, K-ATPaseはウサギよりも強心ステロイドに対する感受性が高いことが示唆された．次に，ウサギ及びラット脳Na, K-ATPase活性のNa^+，K^+，Mg^{2+}，ATP濃度依存性に対するouabain，bufalin，cinobufagin，cinobufotalinの作用を検討した．Ouabainとbufadienolidesはラット及びウサギ脳Na, K-ATPase活性の，Na^+，Mg^{2+}，ATPに対する親和性を増大し，K^+に対する親和性を低下させた．これらの結果は，ouabainと本研究において使用したbufalin，cinobufagin，cinobufotalinは，同様の機構で，Na, K-ATPaseを抑制することを示唆する．すなわち，センソの強心作用及び利尿作用は，ジギタリス類と同様にNa, K-ATPaseの抑制作用に基づくことを示唆する．

キーワード：Na, K-ATPase，bufadienolides，ouabain，強心作用薬

緒　　言

Na, K-ATPaseは動物細胞に広く存在する酵素であり，細胞内の１分子のATPの加水分解と共役して３分子のNa^+を細胞内から細胞外へ，２分子のK^+を細胞外から細胞内に輸送する．その結果，細胞の容積，浸透圧及び含水量の調節，神経や筋肉細胞の興奮性の維持，グルコースやアミノ酸の二次能動輸送などの機能を担う．すべての細胞においてNa, K-ATPaseの維持には，全ATPの30 %を消費する[1−4]．

Na, K-ATPaseの反応機構はPost-Albersの反応機構と呼ばれ，ATP加水分解中に，２種類のリン酸化反応中間体E1PとE2Pを形成する[5, 6]．ジギタリスやouabainなどの強心作用薬はNa, K-ATPaseの特異的な阻害薬とされ，細胞の外側から，Na, K-ATPaseに結合してOuabain-E2Pとして安定化させる．その結果，脱リン酸化は抑制されて無機リン酸の放出量が減少するため，ATPase活性が抑制される[7−11]．

ジギタリスのような強心配糖体は臨床的には強心薬として使用される．陽性変力作用により心不全を改善し，結果として利尿作用も示す．その機構は以下のように説明されている．Na, K-ATPaseの阻害により細胞外へのNa^+輸送が抑制されると，細胞内のNa^+濃度が上昇して細胞内外のNa^+の濃度勾配が小さくなる． その結果，Na^+の濃度勾配を利用してCa^{2+}を細胞外に輸送するNa/Ca交換系によるCa^{2+}の排出が減少する．心筋細胞内のCa^{2+}濃度が上昇すると心筋の収縮力が増大する[7−11]．

センソは，シナヒキガエル（アジアヒキガエル）又はヘリグロヒキガエルの毒腺の分泌物を集めたものであり，日本薬局方では毒薬とされている．中国では唐時代から，センソの薬理作用の価値が見いだされ，「薬性論」に記載されている[12]．センソは麻酔作用や強心作用を示すが，成分や作用機構は長らく不明であった．1938年，Warren Weaverら[13]はセンソ構成成分の構造研究を行い，センソの成分を明らかにした． さらに，Sipersteinらはヒキガエルのコレステロールからステロイド配糖体様物質を抽出した[14]．その後，約100種類の強心配糖体が抽出され，

〒060−8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学分野　細胞分子薬理学教室（主任：鈴木　邦明 特任教授）

bufadienolidesと命名された．Bufadienolidesは主要成分として，bufalin，cinobufagin，cinobufotalinなどを含む[15-17]．

Bufalin，cinobufagin，cinobufotalinはNa, K-ATPaseに対してouabainと類似した阻害作用を示すとする報告もあるが[15-17]．具体的な作用機構には不明な点が多い．本研究の目的はNa, K-ATPaseに対するbufalin，cinobufagin，cinobufotalinの作用と作用機構を詳細に明らかにすることである．

材 料 と 方 法

1．ウサギ及びラット脳からのNa, K-ATPaseの精製

Bufalin，cinobufagin，cinobufotalin（３種をまとめる際はbufadienolidesと記載する）の作用を詳細に解析するために，Jorgensenの方法[18]に従ってNa, K-ATPaseの精製を行った．ウサギおよびラット脳は全脳を用い，結合組織などを取り除いた後に細切し，さらにミキサーにかけてホモジェネートを得た．7,500 rpm，4 ℃で15分間の遠心を行って上清を得，さらに15,000 rpm，45分間の遠心を行って得られた沈渣をミクロソーム分画とした．ミクロソームをSDS処理して可溶化したのちに，Postらの方法[19]に従ってグリセロールの濃度勾配にかけ，15,000 rpm，4 ℃で18時間遠心した．遠心後，Na, K-ATPase活性の高い層を回収し，２倍に希釈後，超遠心機（Beckman Coulter, Indianapolis, Ind）で35,000 rpm，１時間の遠心を行ってNa, K-ATPaseを沈渣に回収して実験に用いた．

精製したNa, K-ATPase標品の比活性は，ラット脳では36.4，ウサギ脳では51.8 μmol Pi/mgタンパク/hourであった．またATPase活性の99%以上がouabain感受性の活性，すなわちNa, K-ATPase活性であった．

2．Na, K-ATPase活性測定

Na, K-ATPase活性測定は，ラット及びウサギ脳Na, K-ATPase，25 mM sucrose，0.1 mM EDTA-tris，50 mM tris-HCl buffer（pH 7.4），160 mM NaCl，16 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，2.5 mM ATPを含む反応液300 μlで行った．反応は，37 ℃の恒温槽で，2.5 mM ATP-trisを加えて開始し，反応時間は60分として，12 % SDS溶液を加えて停止し，ATPの分解により生じた無機リンをChifflet法[20]で発色させて分光光度計で定量した．Lowry法[21]に従ってタンパク質量を定量し，活性は比活性（μmol Pi/mgタンパク/ hour）で示した．

活性に対するbufadienolides及びouabainの作用は，各実験で示した濃度のbufadienolidesあるいはouabainを添加して活性を測定した．また，Na, K-ATPase活性のNa^+，K^+，Mg^{2+}，ATPの濃度依存性に対する実験は，上記の160 mM NaCl，16 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，2.5 mM ATPのかわりに実験に示した濃度のNaCl，KCl，$MgCl_2$あるいはATPを添加して，活性を測定した．さらに，反応液に最大活性の50 %阻害濃度（IC_{50}）に相当するbufadienolides及びouabainを添加して実験を行い，Na, K-ATPase活性のNa^+，K^+，Mg^{2+}，ATPの濃度依存性に対する bufadienolides及びouabainの効果を検討した．

3．試薬と材料

Bufalin，cinobufagin，cinobufotalin，ouabainはSigma-Aldrich Co.社製（St. Louis, MO）を購入した．ウサギ脳は有限会社ジャパン・ラム（広島）から購入した．ラット脳は，北海道大学動物実験指針を遵守し北海道大学動物実験委員会承認（14-0076，15-0029，16-0026，17-0012）を得て行った学生実習後に安楽死されたラットから摘出し使用した．

4．グラフとデータの処理

各図のグラフ上の測定点を結ぶ曲線は，コンピュータを使用して各測定点に最も適合するロジステック曲線を計算して得られた曲線である．各測定点と得られた曲線との相関係数は，ほとんどの場合0.99以上であった．表１から表５に示した50 %活性化濃度（$S_{0.5}$）あるいは50 %阻害濃度（IC_{50}）は，各実験で得られた測定値をもとにHillプロットを行って計算した数値である．

表１ Ouabain及びbufadienolidesによるウサギ及びラット脳Na, K-ATPase活性の50%阻害濃度

IC_{50}（μM）	ウサギ	ラット
Ouabain	0.29	0.26
Bufalin	0.04	0.02
Cinobufagin	0.23	0.09
Cinobufotalin	0.30	0.15

表２ Na, K-ATPase活性のNa^+による50%活性化濃度（$S_{0.5}$）に対するouabain及びbufadienolidesの作用

$S_{0.5}$（mM）	ウサギ	ラット
H_2O	10.97	11.68
Ouabain	9.79	11.35
Bufalin	9.55	9.45
Cinobufagin	8.96	9.12
Cinobufotalin	8.19	9.37

表３ Na, K-ATPase活性のK^+による50%活性化濃度（$S_{0.5}$）に対するouabain及びbufadienolidesの作用

$S_{0.5}$（mM）	ウサギ	ラット
H_2O	1.74	1.80
Ouabain	4.23	4.77
Bufalin	2.23	2.72
Cinobufagin	2.77	3.39
Cinobufotalin	3.08	3.72

表４　Na, K-ATPase活性のMg^{2+}による50％活性化濃度（$S_{0.5}$）に対するouabain及びbufadienolidesの作用

$S_{0.5}$（μM）	ウサギ	ラット
H_2O	3.85	4.38
Ouabain	1.80	1.75
Bufalin	2.00	1.68
Cinobufagin	1.89	1.75
Cinobufotalin	1.82	1.59

表５　Na, K-ATPase活性のATPによる50％活性化濃度（$S_{0.5}$）に対するouabain及びbufadienolidesの作用

$S_{0.5}$（mM）	ウサギ	ラット
H_2O	0.47	0.28
Ouabain	0.31	0.25
Bufalin	0.14	0.14
Cinobufagin	0.19	0.23
Cinobufotalin	0.21	0.22

結　　果

１．Bufadienolides及びouabainよるNa, K-ATPase活性の阻害

ウサギ及びラット脳Na, K-ATPase活性は，いずれもouabain（図1a），bufalin（図1b），cinobufagin（図1c）及びcinobufotalin（図1d）の濃度に依存して抑制された．各測定値から計算したIC_{50}を表１にまとめて示した．Bufadienolidesはウサギ脳Na, K-ATPase活性に対するcinobufotalinを除いて，ouabainよりも強い阻害作用を示した．阻害作用はbufalinが最も強く，cinobufagin，cinobufotalinの順序であった．また，ラット脳Na, K-ATPase活性はウサギと比較して低濃度で阻害された．

２．Na, K-ATPase活性のNa^+濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの作用

ウサギ脳Na, K-ATPase活性のNa^+濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの効果を測定した（図２）．Bufadienolides及びouabainの有無にかかわらず，Na, K-ATPase活性はNa^+濃度依存性に増加して最大値を示したが，IC_{50}値に相当するbufadienolides及びouabain存在下では最大活性は低下した．ラット脳Na, K-ATPaseを使用しても，同様の結果が得られた（data not shown）．得られた結果から，各測定のNa^+濃度の$K_{0.5}$値を表２に示した．Bufadienolides及びouabain存在下の$K_{0.5}$値は非存在下と比較していずれも減少した．その傾向は，ouabainよりもbufadienolides存在下で顕著であった．

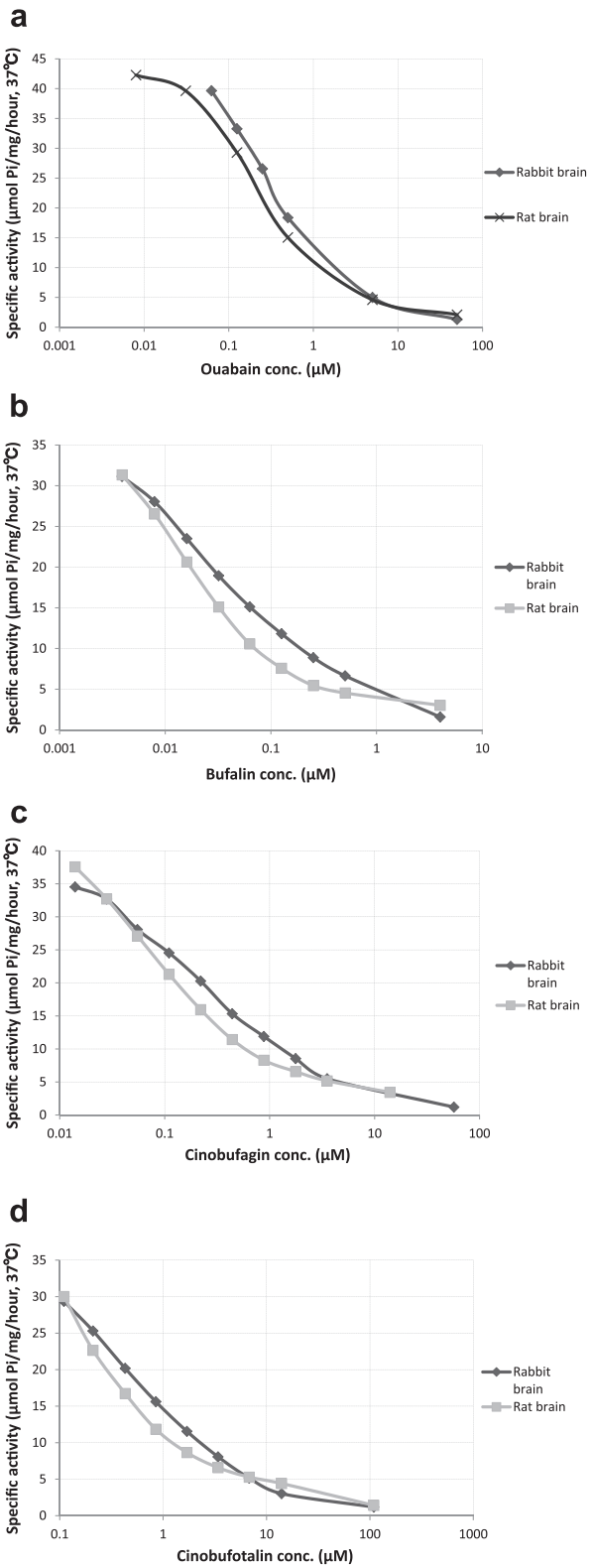

図１　Na, K-ATPase活性のouabain及びbufadienolidesによる阻害

材料と方法に記載した方法でウサギ脳（◆）及びラット脳（×あるいは■）Na, K-ATPase活性を測定した．反応液に種々濃度のouabain（1a），bufalin（1b），ciobufagin（1c）及びcinobufotalin（1d）を添加して活性を測定し，Na, K-ATPase活性のouabain及びbufadienolides濃度依存性を検討した．

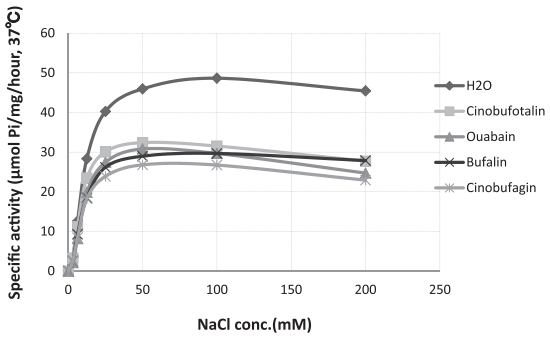

図２　ウサギ脳Na, K-ATPase活性のNa^+濃度依存性に対するouabain及びbufadienolidesの作用

160 mM NaClの代わりに種々濃度のNaClを添加した以外は，材料と方法に記載した方法でウサギ脳Na, K-ATPase活性を測定し，活性のNa^+濃度依存性を測定した（◆）．さらに，反応液にIC_{50}値に相当する濃度のouabain（▲），bufalin（×），ciobufagin（＊）及びcinobufotalin（■）を添加して活性を測定し，Na^+による50%活性化濃度に対するouabain及びbufadienolidesの作用を検討した．

３．Na, K-ATPase活性のK^+濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの作用

ウサギ脳Na, K-ATPase活性のK^+濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの効果を測定した（図３）．Bufadienolides及びouabainの有無にかかわらず，Na, K-ATPase活性はK^+濃度依存性に増加して最大値を示した．ラット脳Na, K-ATPaseを使用しても，同様の結果が得られた（data not shown）．得られた結果から，各測定のK^+濃度の$K_{0.5}$値を表３に示した．Bufadienolides及びouabain存在下の$K_{0.5}$値は非存在下と比較していずれも増加した．

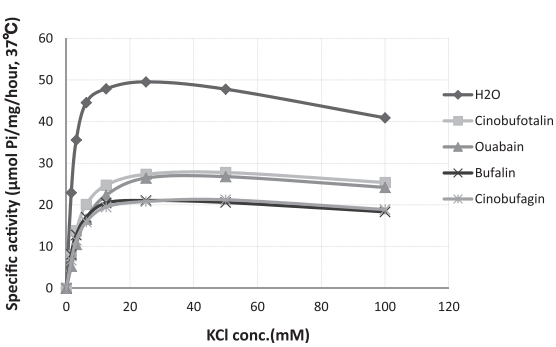

図３　ウサギ脳Na, K-ATPase活性のK^+濃度依存性に対するouabain及びbufadienolidesの作用

16 mM KClの代わりに種々濃度のKClを添加した以外は，材料と方法に記載した方法でウサギ脳Na, K-ATPase活性を測定し，活性のK^+濃度依存性を測定した（◆）．さらに，反応液にIC_{50}値に相当する濃度のouabain（▲），bufalin（×），ciobufagin（＊）及びcinobufotalin（■）を添加して活性を測定し，K^+による50%活性化濃度に対するouabain及びbufadienolidesの作用を検討した．

４．Na, K-ATPase活性のMg^{2+}濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの作用

ウサギ脳Na, K-ATPase活性のMg^{2+}濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの効果を測定した（図４）．Bufadienolides及びouabainの有無にかかわらず，Na, K-ATPase活性はMg^{2+}濃度依存性に増加して最大値を示した．ラット脳Na, K-ATPaseを使用しても，同様の結果が得られた（data not shown）．得られた結果から，各測定のMg^{2+}濃度の$K_{0.5}$値を表４に示した．Bufadienolides及びouabain存在下の$K_{0.5}$値は非存在下と比較していずれも減少した．

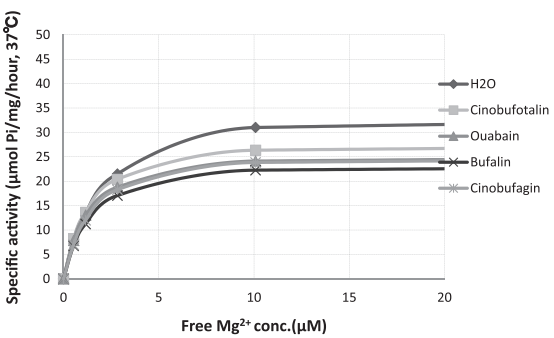

図４　ウサギ脳Na, K-ATPase活性のMg^{2+}濃度依存性に対するouabain及びbufadienolidesの作用

5 mM $MgCl_2$の代わりに種々濃度の$MgCl_2$を添加した以外は，材料と方法に記載した方法でウサギ脳Na, K-ATPase活性を測定し，活性のMg_{2+}濃度依存性を測定した（◆）．さらに，反応液にIC_{50}値に相当する濃度のouabain（▲），bufalin（×），ciobufagin（＊）及びcinobufotalin（■）を添加して活性を測定し，Mg^{2+}による50%活性化濃度に対するouabain及びbufadienolidesの作用を検討した．

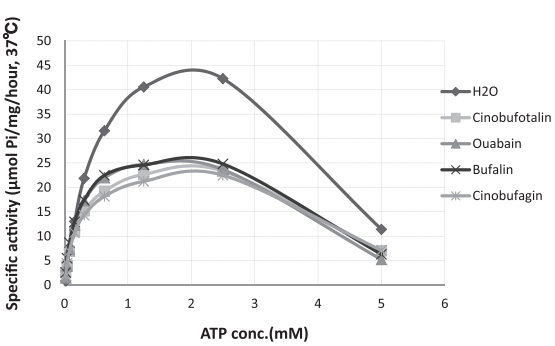

図５　ウサギ脳Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対するouabain及びbufadienolidesの作用

2.5 mM ATPの代わりに種々濃度のATPを添加した以外は，材料と方法に記載した方法でウサギ脳Na, K-ATPase活性を測定し，活性のATP濃度依存性を測定した（◆）．さらに，反応液にIC_{50}値に相当する濃度のouabain（▲），bufalin（×），ciobufagin（＊）及びcinobufotalin（■）を添加して活性を測定し，ATPによる50%活性化濃度に対するouabain及びbufadienolidesの作用を検討した．

5．Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの作用

ウサギ脳Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対するbufadienolides及びouabainの効果を測定した（図５）．Bufadienolides及びouabainの有無にかかわらず，Na, K-ATPase活性はATP濃度依存性に増加して最大値を示したのち，さらに高濃度では基質阻害により低下した.ラット脳Na, K-ATPaseを使用しても，同様の結果が得られた（data not shown）．得られた結果から，各測定のATP濃度の$K_{0.5}$値を表４に示した．Bufadienolides及びouabain存在下の$K_{0.5}$値は非存在下と比較していずれも減少した.

考　　察

漢方薬のセンソは強心作用や利尿作用を示し，心不全や浮腫の治療に使用される[12, 15, 17]．センソの主要成分であるbufalin, cinobufagin, cinobufotalinはNa, K-ATPase活性を抑制するとの報告があるが，詳細は不明な点が多い[16, 17]．そこで，Na, K-ATPase活性に対するbufalin, cinobufagin, cinobufotalinの作用を，Na, K-ATPaseに対する特異的な阻害薬であり作用機構が確立されているouabainと比較した．その結果，bufadienlidesはouabainよりも強いNa, K-ATPase活性阻害作用を示し（図１ａ－ｄ，表１），特にbufalinの作用が最も強かった．Bufadienolidesとouabainなどのジギタリス類は，いずれも強心ステロイドとしてステロイド骨格と不飽和ラクトン環の共通構造を持つ．Bufadienolidesとジギタリス類の相違は，bufadienolidesの不飽和ラクトン環が六員環であるのに対してジギタリス類は五員環であること，およびジギタリス類が糖を含む配糖体であるのに対して，今回使用したbufadienolidesは糖を含まないことである[16, 17]．さらにbufadienolidesにはステロイド骨格のHが，OH, $OCOCH_3$などに置換されたさまざまな誘導体が存在する．Bufadienolidesは共通してouabainよりも強いNa, K-ATPase活性阻害作用を示したことから，Na, K-ATPaseへの結合と活性阻害において，配糖体であると作用が低下するか，不飽和ラクトン環が六員環であるほうが五員環よりも作用が増加する，あるいはその両者であることを示唆する．また，bufalinとcinobufagin及びcinobufotalinの構造上の最大の相違は，cinobufagin及びcinobufotalinはステロイド骨格に$OCOCH_3$を持つのに対し，bufalinは持たないことである．BufalinのNa, K-ATPase活性阻害作用がcinobufagin及びcinobufotalinと比較して強いのは，ステロイド骨格に$OCOCH_3$を持たないことに起因する可能性がある．

ジギタリス類やouabainの強心作用は，心筋細胞のNa, K-ATPase活性を阻害することによって細胞内のNa^+濃度が増加し，その結果Na/Ca交換系が抑制されて細胞内のCa^{2+}濃度が増加することによる[7-11]．しかし，Na, K-ATPaseは全身の細胞に存在して細胞の機能を維持する酵素であるため，過度のNa, K-ATPase活性阻害は細胞機能の障害を引き起こす．従って，ジギタリス類やouabainは毒性が強く，安全域が狭いため投与量と投与方法に注意が必要な薬物である．漢方薬であるセンソはさまざまな薬理作用を示すが，強心作用および利尿作用はbufadienolidesによる作用と考えられている[15-17]．センソは生体に対する作用が強く，中国でも最近は単独で使用されることは少ないとされている．本研究において，bufadienolidesはouabainよりも強いNa, K-ATPase活性阻害作用を示したことから，センソの生体に対する強い作用はbufadienolidesによるNa, K-ATPase活性阻害に基づく可能性がある．

OuabainはPost-Albersの反応機構においてE2Pに親和性が高く，結合するとE2Pを安定化して脱リン酸化を阻害し，ATPase活性を抑制することが報告されている[1-4]．その結果，ouabainはNa, K-ATPase活性のNa^+，Mg^{2+}，ATPに対する親和性を増加し，K^+に対する親和性を低下させると報告されている[8-11]．本研究において，bufadienolides及びouabainは，いずれもNa, K-ATPase活性のNa^+，Mg^{2+}，ATP濃度依存性に対する50%活性化濃度を減少させた（図２，４，５，表２，４，５）．すなわち，Na^+，Mg^{2+}，ATPに対する親和性を増加させることを示唆する．一方，K^+濃度依存性に対する50%活性化濃度は増加し（図３，表３），K^+に対する親和性を低下させることを示唆する．これらの結果は，bufadienolidesはouabainと同様の作用機構によりNa, K-ATPase活性を抑制することを示唆する．ジギタリスやouabainは心筋細胞のNa, K-ATPase活性を阻害することによって強心作用を示すことが確立されていることから，センソの作用である強心作用や利尿作用は，bufadienolidesによるジギタリスと同様の作用機序により発現することを示唆する．

結　　論

ウサギ及びラット脳から精製したNa, K-ATPase活性に対する，bufalin，cinobufagin，cinobufotalinの阻害効果を調べた．これらのbufadienolidesはouabainと同様の作用機構で，ouabainよりも強いNa, K-ATPase阻害作用を示した．センソによる強心作用及び利尿作用はbufadienolidesによる作用であるとされていることから，その作用機構はジギタリス類と同様であることが示唆された．

引　用　文　献

1）Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martin-Vasallo P：Na^+, K^+-ATPase isozyme diversity; Comparative Biochemistry and physiological implications of novel

functional interactions. Bioscience Reports 20 : 51-91, 2000.
2) Glynn IM : The Na^+, K^+-transporting adenosine triphosphatase. in The Enzymes of Biological Membranes (Martonossi A, ed) Vol. 3, 35-114, Plenum Publishing Corp., New York, 1985.
3) Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlish SJD : Structure and mechanism of Na, K-ATPase: Functional site and their interactions. Annu Rev Physiol 65 : 817-849, 2003.
4) 鈴木邦明，渋谷真希子，長谷由里，平沖敏文，木村幸文，藤澤俊明：全身及び局所麻酔薬の作用機序．北海道歯誌，37 : 116-123, 2017.
5) Post RL, Kume S, Tobin T, Orcutt B, Sen AK : Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. J Gen Physiol 54 : 306s-326s, 1969.
6) Post RL, Hegyvary C, Kume S : Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J Biol Chem 247 : 6530-6540, 1972.
7) Matchkov VV, Krivoi II : Specialized functional diversity and interactions of the Na, K-ATPase. Front Physiol 7, article 179 (21 pages), 2016.
8) Lingrel JB : The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase. Annu Rev Physiol 72 : 395-412, 2010.
9) Xie Z, Askari A : Na^+/K^+-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 269 : 2434-2439, 2002.
10) Jun DW, Hwang M, Kim HJ, Hwang SK, Kim S, Lee CH : Ouabain, a cardiac glycoside, inhibits the Fanconi Anemia/BRCA pathway activated by DNA interstrand cross-linking agents. PLoS ONE 8 : e75905, 2013.
11) Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R : Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochim. Biophys. Acta 1776 : 32-57, 2007.
12) Zhijun S :「薬性論」の時代と著者についての検討. J Anhui College of Traditional Chinese Medicine : 1992.
13) Warren W : "Molecular biology : origin of the term". Science 170 : 591-592, 1970.
14) Siperstein MD, Murray AW, Titus E : Biosynthesis of cardiotonic sterols from cholesterol in the toad, Bufo marinus. Archiv Biochem Biophys 67 : 154-160, 1957.
15) 山原條二：センソ強心ステロイドの灌流心臓に対する強心作用特性と，実験的虚血性心不全に対するCinobufaginの作用．日薬理誌，88 : 413-423, 1986.
16) Yang Z, Luo H, Wang H, Hou H : Preparative Isolation of Bufalin and Cinobufagin from Chinese Traditional Medicine Chan Su. J Chromato Sci 46 : 81-85, 2008.
17) センソ，中華人民共和国薬局方2015，中国医療科学技術院プレス : a316, 2015.
18) Jorgensen PL : Purification and characterization of (Na^+ + K^+)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. Biochim Biophys Acta 466 : 97-108, 1977.
19) Suzuki K, Post RL : Equilibrium of phosphointermediates of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase - Action of sodium ion and Hofmeister effect. J Gen Physiol 109 : 537-554, 1997.
20) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S : A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein : application to lens ATPase. Anal Biochem 168 : 1-4, 1988.
21) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951.

ORIGINAL

The effects of bufadienolides on Na, K-ATPase activity in rat and rabbit brain

Jia Li, Kuniaki Suzuki, Shaoyi Su, Hajime Minamikawa and Yoshitaka Yoshimura

ABSTRACT : The use of toad venom in Chinese medicine includes approximately 100 kinds of bufadienolides. Bufadienolides are cardiotonic steroids similar to the digitalis which is a heart failure therapeutic drug, and show inhibition of the Na, K-ATPase activity, but there are few reports. This study was carried out for the purpose of determining the effects of bufadienolides on Na, K-ATPase and its mechanism. We examined the effects of bufalin, cinobufagin, cinobufotalin, and ouabain, one of digitalis-like substances, on Na, K-ATPase activity purified from rabbit and rat brains. Bufadienolides and ouabain approximately demonstrated complete inhibition of rabbit and rat brain-derived Na, K-ATPase activity. The 50 percent inhibitory concentrations for both Na, K-ATPase activites were 290 and 260 nM for ouabain, 40 and 20 nM for bufalin, 230 and 90 nM for cinobufagin and 300 and 150 nM for cinobufotalin. Excluding cinobufotalin for rabbit brain Na, K-ATPase, bufadienolides showed stronger inhibitory effect than ouabain, specific inhibitor of Na, K-ATPase, and bufalin showed particularly strong effects. It was suggested that rat brain Na, K-ATPase was more susceptible to the cardiotonic steroid than rabbit brain. We then examined the effects of ouabain, bufalin, cinobufagin, cinobufotalin on Na^+, K^+, Mg^{2+} and ATP concentration-dependency of rabbit and rat brain Na, K-ATPase activity. Ouabain and bufadienolides increased the affinity for Na^+, Mg^{2+} and ATP of Na, K-ATPase activity, and reduced affinity for K^+. These results suggest that bufalin, cinobufagin, cinobufotalin inhibit Na, K-ATPase by a similar mechanism of ouabain. In other words, cardiotonic action and diuretic effects of toad venom are based on the inhibitory effect of Na, K-ATPase similar to digitalis.

Key Words : Na, K-ATPase, bufadienolides, ouabain, cardiotonic steroid

Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Specially Appointed Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-Ku, Sapporo, 060-8586, Japan