



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)	李, 加
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13060号
Issue Date	2018-03-22
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13060">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13060</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/70762">https://hdl.handle.net/2115/70762</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Li_Jia.pdf



# 博士論文

---

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

---

平成30年3月申請

北海道大学  
大学院歯学研究科口腔医学専攻

李 加

## 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<sup>+</sup>を細胞内から細胞外へ、2 分子の K<sup>+</sup>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。すべての細胞は Na, K-ATPase の維持に、合成した ATP の 30%を消費する<sup>1-4)</sup>。

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<sup>5,6)</sup>。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の放出量が減少するため、ATPase 活性が抑制される<sup>7-11)</sup>。

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確立されている。Na, K-ATPase の阻害により細胞外への Na<sup>+</sup>輸送が抑制

されると、細胞内の $\text{Na}^+$ 濃度が上昇して細胞内外の $\text{Na}^+$ の濃度勾配が小さくなる。その結果、 $\text{Na}^+$ の濃度勾配を利用して $\text{Ca}^{2+}$ を細胞外に輸送する $\text{Na}/\text{Ca}$ 交換系による $\text{Ca}^{2+}$ の排出が減少する。心筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇すると心筋の収縮力が増大する<sup>7-11)</sup>。

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る。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<sup>12)</sup>。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らは<sup>13)</sup>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<sup>14)</sup>。その後、約100種類の強心配糖体が抽出され、bufadienolidesと命名された。Bufadienolidesは主要成分として、bufalin, cinobufagin, cinobufotalinなどを含む<sup>15-17)</sup>。

Bufalin, cinobufagin, cinobufotalinは $\text{Na, K-ATPase}$ 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<sup>15-17)</sup>。具体的な作用機構には不明な点が多い。本研究の目的は $\text{Na, K-ATPase}$ 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 $\text{Na, K-ATPase}$ の精製

Bufalin, cinobufagin, cinobufotalin（3種をまとめる際はbufadienolides

とする) の作用を詳細に解析するために, Jorgensen の方法<sup>18)</sup>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°C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マイクロソーム分画とした. マイクロソームを SDS 処理して可溶化したのちに, Post らの方法<sup>19)</sup>に従ってグリセロールの濃度勾配にかけ, 15,000 rpm, 4°C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, Backman の超遠心機で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  $\mu\text{molPi}/\text{mg タンパク}/\text{hour}$  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  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM ATP を含む反応液 300  $\mu\text{l}$  で行った. 反応は, 37°C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<sup>20)</sup>で発色させて分光光度計で定量した. Lowry 法<sup>21)</sup>に従ってタンパク質量を定量し, 活性は比活性 ( $\mu\text{molPi}/\text{mg タンパク}/\text{hour}$ ) 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , 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  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM ATP のかわりに実験に示した濃度の NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$  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 ( $\text{IC}_{50}$ ) 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , 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

Bufalin, cinobufagin, cinobufotalin, ouabain は Sigma-Aldrich Co. 社製 (St. Louis, MO) を購入した。その他の試薬は特級を使用した。

### 4. グラフとデータの処理

各図の各測定点に与えられた曲線は、測定点にベストフィットを与えるロジステック曲線をコンピュータにて計算した結果である。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 に示した数値は、得られた結果に対して Hill プロットを行って計算した 50%活性化濃度 ( $S_{0.5}$ ) あるいは 50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) である。

## 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 (Fig. 1a), bufalin (Fig. 1b), cinobufagin (Fig. 1c) 及び cinobufotalin (Fig. 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 (Fig. 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 (グラフは示さない)。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。

### 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 (Fig. 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 (グラフは示さない). 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.

#### 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 (Fig. 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 (グラフは示さない). 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.

#### 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 (Fig. 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 (グラフは示さない). 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<sup>12, 15, 17)</sup>. 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<sup>16, 17)</sup>. そこで, Na, K-ATPase 活性に対する bufalin, cinobufagin, cinobufotalin (まとめて bufadienolides とする) 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の確立されている ouabain と比較した.

Bufadienolides は, ouabain よりも強い Na, K-ATPase 活性阻害作用を示した (Figs. 1a-d, 表 1). センソは生体に対する作用が強く, 中国でも最近では単独で使用されることは少ないとされている. ジギタリス類や ouabain は安全域が狭く投与量と投与方法に注意が必要な薬物であるが, センソはさらに強い作用を示すことが, ouabain よりも強い Na, K-ATPase 活性阻害作用により示唆された.

Bufadienolides 及び ouabain は, いずれも Na, K-ATPase 活性の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP

濃度依存性に対する 50%活性化濃度を減少させた (Figs. 2, 4, 5, 表 2, 4, 5). すなわち,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP に対する親和性を増加させることを示唆する. 一方,  $\text{K}^+$ 濃度依存性に対する 50%活性化濃度は増加し (Fig. 3, 表 3),  $\text{K}^+$ に対する親和性を低下させることを示唆する. Ouabain によるこれらの結果はすでに報告されている結果と一致する<sup>8-11)</sup>. 本研究結果は, 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す.

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は確立されている<sup>1-4)</sup>. また, 緒言において記載したように, ジギタリスや ouabain は心筋の 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も確立されている. 以上の結果は, 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, ジギタリス類と同様の作用機構であることが示唆された.

## 引用文献

- 1) Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martin-Vasallo P: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; Comparative Biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Bioscience Reports 20: 51-91, 2000.
- 2) Glynn IM: The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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, Karlsh 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-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.

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

IC50 ( $\mu$ M)	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<sup>+</sup>による 50%活性化濃度 (S0.5) に対する ouabain 及び bufadienolides の作用

S0.5 (mM)	ウサギ	ラット
H2O	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<sup>+</sup>による 50%活性化濃度 (S0.5) に対する ouabain 及び bufadienolides の作用

S0.5 (mM)	ウサギ	ラット
H2O	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 (S0.5) に対する ouabain  
及び bufadienolides の作用

S0.5 ( $\mu$ M)	ウサギ	ラット
H2O	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 (S0.5) に対する ouabain  
及び bufadienolides の作用

S0.5 (mM)	ウサギ	ラット
H2O	0.47	0.28
Ouabain	0.31	0.25
Bufalin	0.14	0.14
Cinobufagin	0.19	0.23
Cinobufotalin	0.21	0.22

## 図の説明

Fig. 1a-d 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.

Fig. 2 ウサギ脳 Na,K-ATPase 活性の  $\text{Na}^+$ 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  $\text{Na}^+$ 濃度依存性を測定した (◆). さらに, 反応液に  $\text{IC}_{50}$  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,  $\text{Na}^+$ 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.

Fig. 3 ウサギ脳 Na,K-ATPase 活性の  $\text{K}^+$ 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  $\text{K}^+$ 濃度依存性を測定した (◆). さらに, 反応液に  $\text{IC}_{50}$  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<sup>+</sup>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.

Fig. 4 ウサギ脳 Na,K-ATPase 活性の Mg<sup>2+</sup>濃度依存性に対する ouabain 及び bufadienolides の作用

5 mM MgCl<sub>2</sub> の代わりに種々濃度の MgCl<sub>2</sub> 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<sup>2+</sup>濃度依存性を測定した(◆). さらに, 反応液に IC<sub>50</sub> 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<sup>2+</sup>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.

Fig. 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<sub>50</sub> 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.

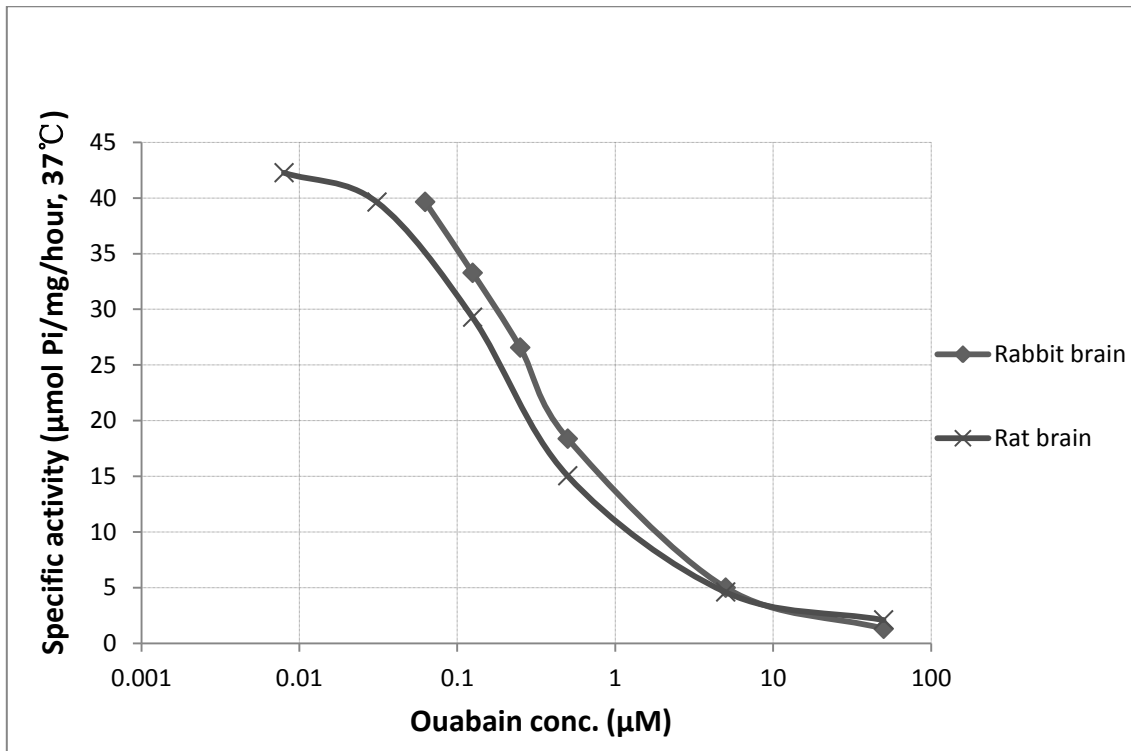


Fig. 1a

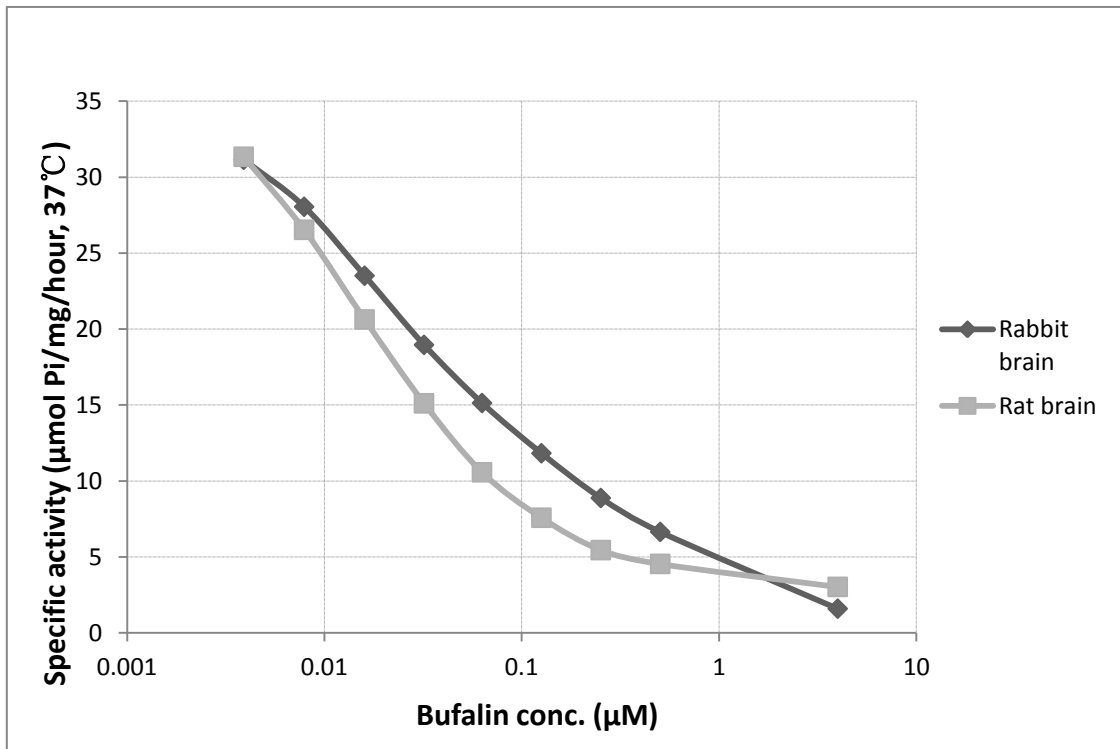


Fig. 1b

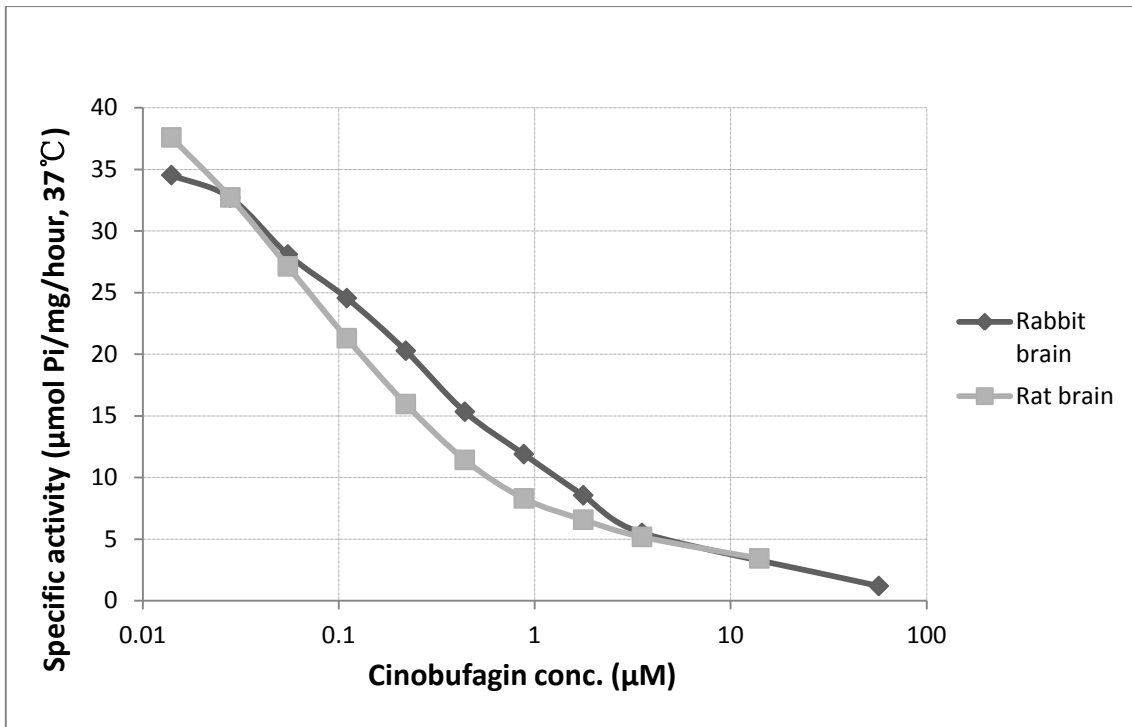


Fig. 1c

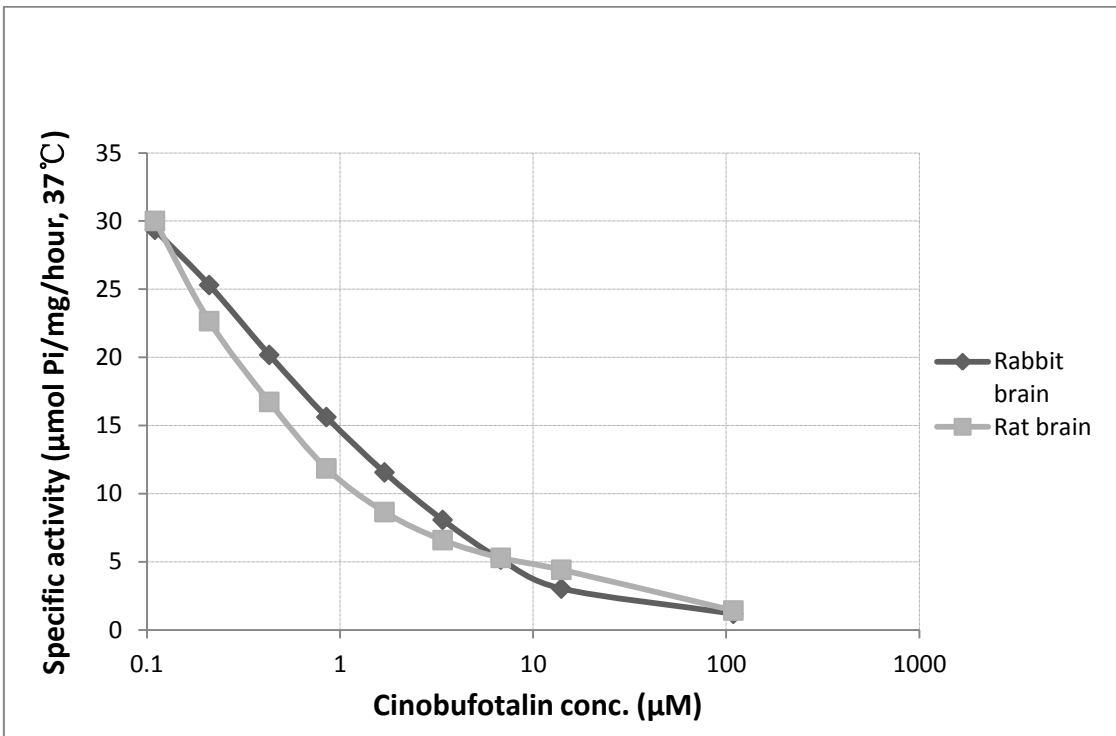


Fig. 1d

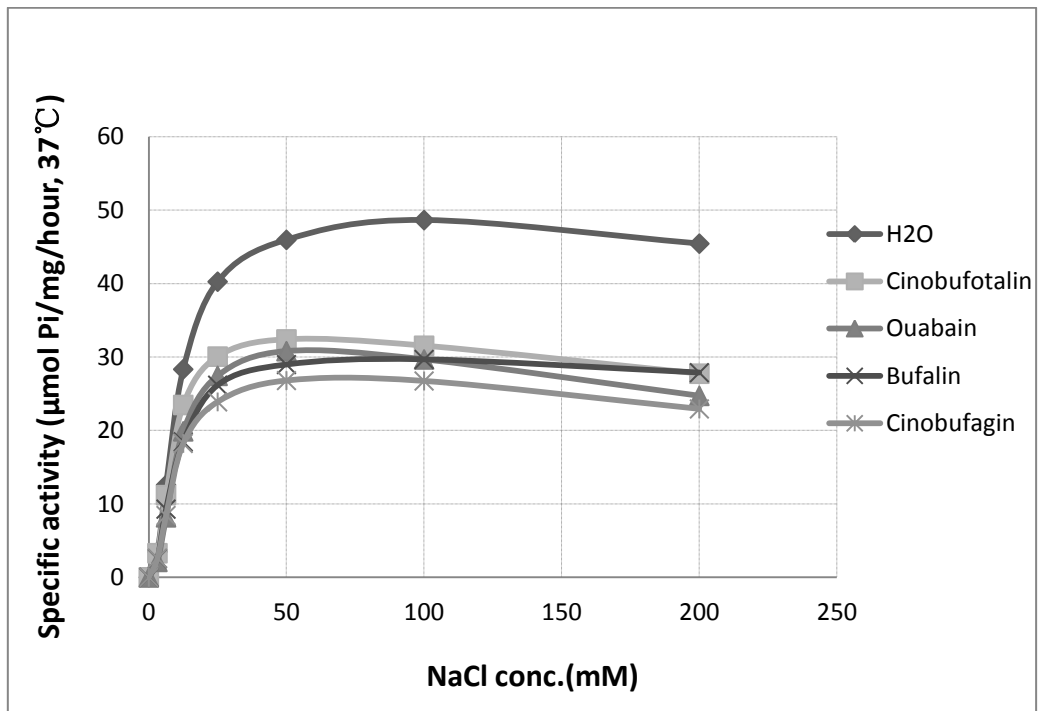


Fig. 2

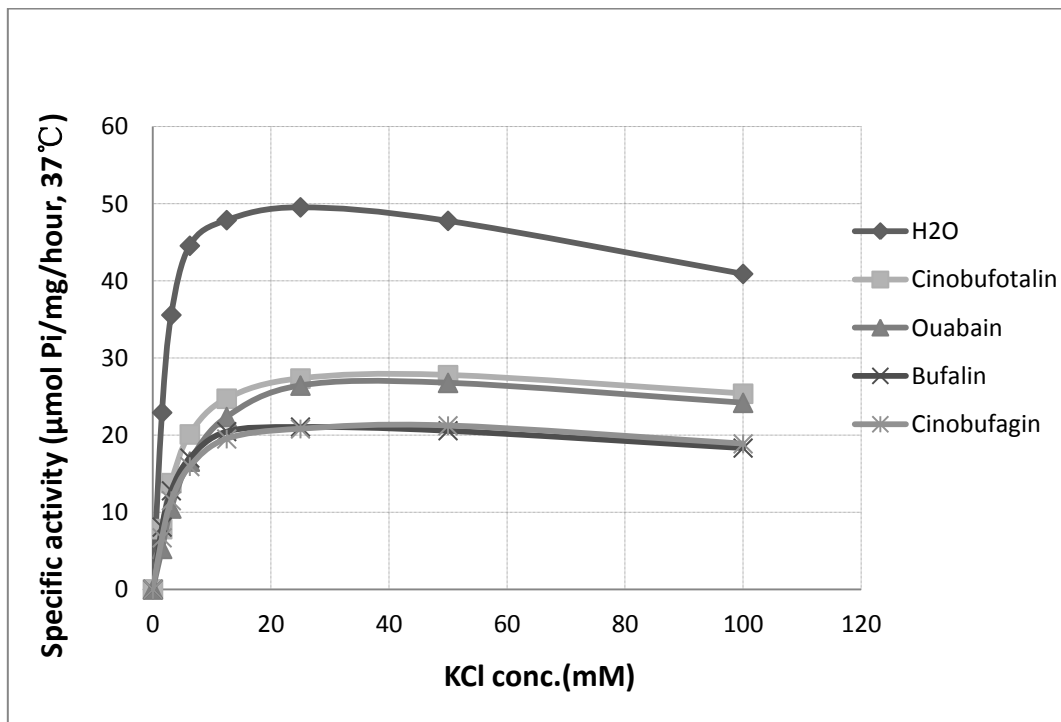


Fig. 3

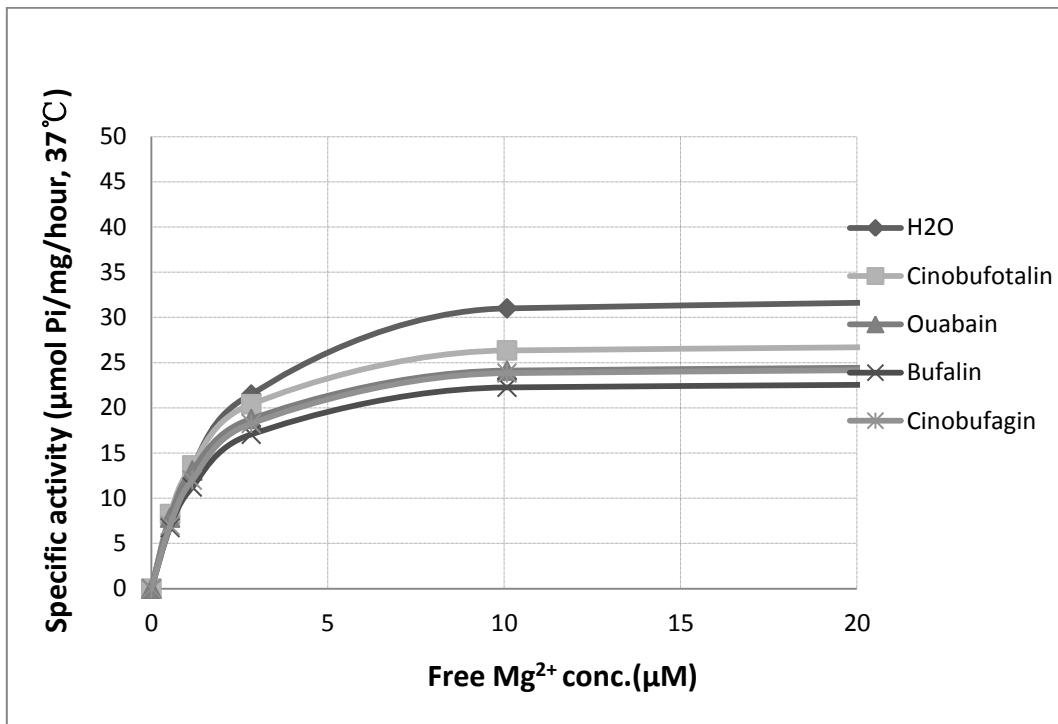


Fig. 4

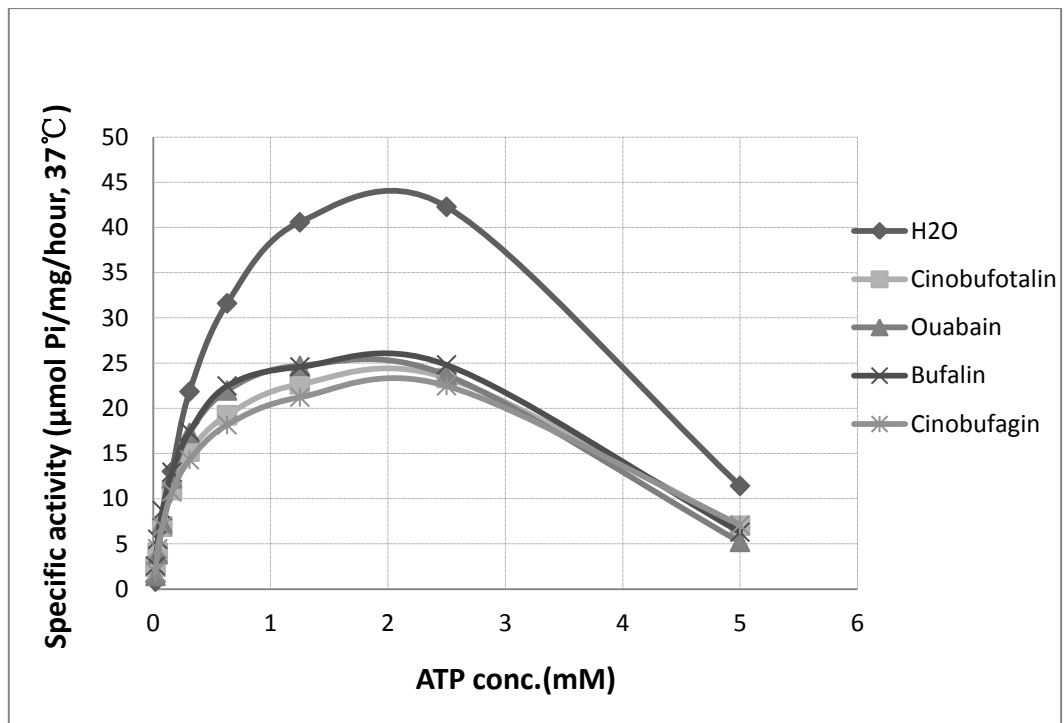


Fig. 5

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

Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Kuniaki Suzuki)

The Toad Venom of the Chinese medicine includes approximately 100 kinds of bufadienolides. Bufadienolides are cardiotonic steroid 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 effects of bufadienolides on Na,K-ATPase and its mechanism. We examined effects of bufalin, cinobufagin, cinobufotalin, and ouabain, one of digitalis-like substances, on Na,K-ATPase activity purified from rabbit and rat brain. Bufadienolides and ouabain approximately completely inhibited rabbit and rat brain Na,K-ATPase activity. The 50 percent inhibitory concentrations for both Na,K-ATPase activities 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. Except cinobufotalin for rabbit brain Na,K-ATPase, bufadienolides showed stronger inhibitory effect than ouabain, specific inhibitor of Na,K-ATPase, and bufalin showed strong effects particularly. It was suggested that rat brain Na,K-ATPase was more susceptible to the cardiotonic steroid than rabbit. Then, we examined the effects of ouabain, bufalin, cinobufagin, cinobufotalin on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ATP concentration-dependency of rabbit and rat brain Na,K-ATPase activity. Ouabain and bufadienolides increased the affinity for Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ATP of Na,K-ATPase activity, and reduced affinity for K<sup>+</sup>. These results suggest that bufalin, cinobufagin, cinobufotalin inhibit Na,K-ATPase by a similar mechanism of ouabain. In other words, cardiotonic action and diuretic effect of the Toad Venom are based on inhibitory effect of

Na,K-ATPase similar to digitalis.

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