

## Mitochondria의 Calcium Uptake에 미치는 Ouabain의 영향\*

서울대학교 의과대학 약리학교실

홍사악 · 박찬웅 · 김명석 · 정명희

=Abstract=

### Effect of Ouabain on the Interaction of Mitochondria with Calcium

Sa Aek Hong, Chan Woong Park, Myung Suk Kim and Myung Hee Chung

*Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University*

Many studies on the mechanism of the inotropic action of cardiac glycosides have shown the possible intimate relationship between the mobilization of intracellular calcium and inotropic effect.

Evidence obtained from recent studies suggests that cardiac glycosides may increase the intracellular  $Ca^{++}$  concentration through the release of this ion from cellular or intracellular membrane.

It seemed imperative to study the effect of ouabain on the interaction between mitochondria and  $Ca^{++}$ , because mitochondria are known to have a rather powerful  $Ca^{++}$  pump mechanism which may have an important role on the regulation of intracellular  $Ca^{++}$  concentration.

The present investigations was made into the effect of ouabain on  $Ca^{++}$  uptake of mitochondria in the presence of ATP and its dependence on  $K^+$  and  $Na^+$  in the medium.

The results are summarized as follows:

1. The rate of rise in the turbidity of superprecipitation was solely influenced by ionic strength of the medium, not by the species of ion, i.e.  $Na^+$  or  $K^+$ . The higher ionic strength suppressed and the lower enhanced the rate of superprecipitation respectively.
2. No effect of ouabain was found on the rate of superprecipitation.
3. Mitochondria depressed the rate of superprecipitation, and the depressed rate of superprecipitation by mitochondria was reversed by ouabain, and the degree of this reversal was almost identical in  $Na^+$  and  $K^+$  medium.
4.  $Ca^{++}$  uptake of mitochondria was inhibited by ouabain in the presence of ATP and the degree of inhibition showed the dose-response manner in terms of concentration of ouabain.
5. In the absence of ATP, mitochondria took up the  $Ca^{++}$  in initial period but released it later. Such uptake and release of  $Ca^{++}$  was not influenced by ouabain.
6. It is suggested that intracellular calcium mobilization by ouabain through the action upon the mitochondria was due to inhibition on ATP-dependent  $Ca^{++}$  uptake by this agent, not to the action upon so called binding.

서 론

\* 본 논문은 CMB Grant No. 68-033-3에 의하여 수행 되었음.

Cardiac Glycosides(CG)가 심장에 inotropic action 을 가지고 있음은 잘 알려져 있지만 이 작용의 기본 me-

chanism은 아직도의견의 일치를 보지 못하고 있다.

그러나 Bailey와 Dresel<sup>11)</sup>은 심근(cat)의 rapidly exchangeable  $Ca^{++}$ 이 심근 수축에 직접적인 영향을 미치며, 이 분획(혹은 contraction dependent pool)의  $Ca^{++}$  농도가 심근 수축력에 결정적인 역할을 한다고 보고 하였으며, 또한 CG가 세포내  $Ca^{++}$ 의 이동(mobilization)에 영향을 미치고 있음이 밝혀 지므로써<sup>2,3)</sup> 근 수축과 이완의 excitation-contraction coupling<sup>4)</sup>에 있어서  $Ca^{++}$ 에 대한 CG의 작용이 이 약물의 inotropic action의 유력한 학설로 주장되고 있으며, 주로 sarcoplasmic reticulum(SR)과  $Ca^{++}$ 과의 상호작용에 CG의 영향이 보고 되었다.

즉 Lee<sup>5)</sup>는 glycerol-extracted cardiac fiber가 ouabain에 의해 contractile tension이 증가됨을 관찰하였고, 이 같은 작용은 오로지 "relaxing factor"(SR)가 존재할 때만 나타나므로 CG의 inotropic action은 SR의  $Ca^{++}$  uptake 억제로 인한  $Ca^{++}$ 농도의 증가에 기인한다고 보고 하였다.

Lee, Yu, 그리고 Struthers<sup>6)</sup>등은 심근의 SR은 medium으로부터  $Ca^{++}$ 을 uptake하여 myofibril의 syneresis를 억제하였고, SR의 이 억제작용은 전기 자극에 의해 유리된  $Ca^{++}$ 에 의하여 reverse됨을 관찰하고 이 reverse 정도는 ouabain에 의해 촉진됨을 보고하면서 SR의  $Ca^{++}$ 에 대한 작용에 ouabain이 영향을 미침을 보고하였다.

Lee, Shin, 그리고 Kang<sup>7)</sup>등은 cardiac actomyosin의 superprecipitation은 SR에 의해 억제되었으며, SR의 이 억제작용은 CG에 의해 reverse됨을 관찰하고 아울러 이 reverse 정도는 CG의 inotropic potency가 강할수록 증가됨을 보고 하였다.

한편 Lee, Tanaka, Yu<sup>8)</sup>등은 excitation-contraction coupling의 실험 model로부터 전기 자극에 의해 SR에서  $Ca^{++}$ 이 유리됨을 관찰하고 또한 microsomal granule(SR)의  $Mg^{++}$ -activated ATPase가  $Na^+$ 보다  $K^+$ 에 의해 더 stimulation되는 결과로부터 SR의  $Ca^{++}$  유리는  $Na^+$  medium에서 더 촉진됨을 시사하였다.

더욱이 Lee, Choi<sup>9)</sup>등은 SR의  $Ca^{++}$  uptake는 ouabain에 의해 억제되었고 이 억제 정도는 또한 KCl medium에서 보다는 NaCl medium에서 더 두드러짐을 보고하였다.

그러나  $Ca^{++}$ 농도를 조절하는 세포내 organelle로는 SR 이외에도 electron transport 결과로 생긴 energy를 이용하여  $Ca^{++}$ 을 능동적으로 uptake하는 강력한 pump mechanism을 가진 mitochondria<sup>10)</sup>가 있으며, Green<sup>11)</sup>

등은 개심장 mitochondria에서  $Ca^{++}$ 의 능동적 uptake가 일어나고 있음을 보고하였다.

또한 최근 연구에 의하면<sup>12)</sup> 근 이완시 세포내  $Ca^{++}$ 이 mitochondria로 축적이 일어남을 보고하면서 mitochondria역시 excitation-contraction coupling에 관여함을 시사하였다.

따라서 저자들은 개심장 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake에 ouabain의 영향을 관찰함과 아울러 이의  $Na^+$ 과  $K^+$ 의 ion 종류에 따르는 효과를 관찰하여 보고하는 바이다.

## 실험방법 및 재료

### 1. Actomyosin

Ebashi<sup>13)</sup>의 방법으로 개심장에서 추출한 natural actomyosin을 사용했다. 최종 KCl 농도는 0.6 M로 하고 동량의 glycerol과 혼합하여  $-20^{\circ}C$ 에 보관한 후 매 실험 때마다 50 mM KCl, 5 mM  $Na_2EDTA$ , Tris buffer pH 7.0으로 한 용액 9 volume에, 저장 actomyosin 1 volume의 비율로 넣고 14,000  $\times g$ 로 20분 동안 원심분리하여 세척한 후 실험에 사용했다.

### 2. Mitochondria

20 kg 내외의 개를 nembutal로 마취시켜 적출한 50g 정도의 심장을 8 volume의 0.25 M sucrose 용액과 섞어 waring blender로 20초씩 세번 총 1분 동안 갈아낸 후 teflon homogenizer로 pestle을 상하로 왕복하면서 1분 간 homogenize하였다. 이 suspension을 600  $\times g$ 로 10분 간 원심분리하여 얻은 상등액을 재차 600  $\times g$ , 10분 간 원심분리하여 세척하고 이를 8,000  $\times g$  10분 간 원심분리하여 얻은 pellet를 2 volume의 0.25 M sucrose 용액에 혼합하여 12,000  $\times g$ 에 10분 간 2회 세척하여 실험에 사용하였고, 상기 모든 조작은  $4^{\circ}C$  이하에서 행하였다.

### 3. Superprecipitation

반응조건은 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM Tris ATP로 고정하고 KCl과 NaCl 농도는 60 mM에서 100 mM까지 변화시켰으며,  $Ca^{++}$ 은 따로 첨가하지 않고 반응액중에 contamination된 것으로 대신하였다.

Actomyosin의 농도는 0.5 mg protein/ml of reaction mixture가 되도록 하고, mitochondria가 첨가된 superprecipitation system은 KCl, NaCl 농도를 60 mM로 고정하였으며, mitochondria 첨가 후 10분 간 incubation하였고 2 mM succinate와 2 mM inorganic phosphate를 추가첨가하고 ATP로 superprecipitation을 시작하였

다. 첨가된 mitochondria의 농도는 0.4 mg protein/ml of reaction mixture로 하였으며, ouabain의 농도는  $10^{-5}M$ 을 택하여 전 반응액은 2.5 ml가 되도록 하였다.

Superprecipitation정도는 Hitachi-Perkin-Elmer Spectrophotometer를 사용하여 545 m $\mu$ 에서 O.D.의 변화를 측정하므로써 정했으며, spectrophotometer에 Sargent linear-log gear recorder를 연결하여 경시적으로 O.D.의 변화를 기록했다. 상기 모든 조작은 25°C에서 행하였고 actomyosin과 mitochondria 농도 측정은 biuret method를 사용하였다.

#### 4. Mitochondria의 Ca<sup>++</sup> uptake 측정

반응액 5 ml 속에 0.25 M sucrose, 3 mM imidazole buffer pH 7.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM inorganic phosphate, 4 mM succinate, 4 mM Tris-ATP, 0.33 mM Ca<sup>++</sup> (labeled Ca<sup>++45</sup>)이 포함되게 하고 25°C에서 incubation 하였다. Mitochondria는 1 mg protein/ml of reaction mixture를 첨가하고 일정시간 경과한 후 반응액 일부를 취하여 millipore filter (HA 0.45  $\mu$ )로 여과하고, 그 여과액의 radio activity를 Beckman Low beta II Model 16000로 측정하여 Ca<sup>++</sup> uptake를 결정하였다.

### 실험 성적

#### 1. Ion의 종류와 각 ion의 농도가 superprecipitation에 미치는 영향

ATP첨가 후 actomyosin gel suspension의 maximum turbidity는 ion의 농도가 낮은 medium에서 높은 O.D.를 나타내고 높은 medium에서 낮은 값을 보여주는 경

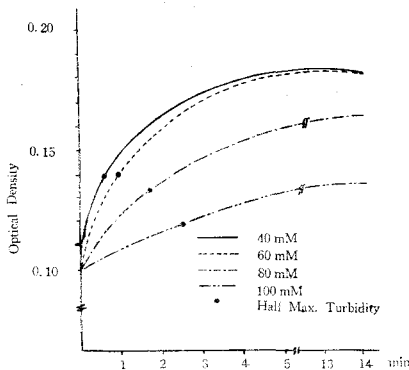


Fig. 1. Effect of various K<sup>+</sup> concentration on ATP induced change in the turbidity of actomyosin gel suspension. Medium contained 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP and actomyosin 0.5 mg/ml of reaction mixture. Temp. 25°C

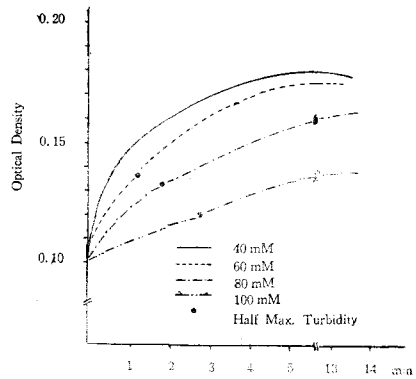


Fig. 2. Effect of various Na<sup>+</sup> concentration on ATP induced change in the turbidity of actomyosin gel suspension. Condition: 20mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP and actomyosin 0.5 mg/ml of reaction mixture. Temp. 25°C

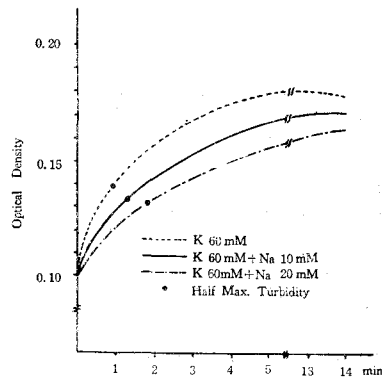


Fig. 3. Combined effect of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> on ATP induced change in the turbidity of actomyosin gel suspension. Medium condition: Same as Fig. 1. & 2

향이 있으며, half-maximum turbidity에 도달되는 시간도 낮은 농도에서 빠르고 높은 농도에서 늦어졌다(Fig. 1, 2, 3). 즉 K<sup>+</sup>의 영향(Fig. 1)을 보면 maximum turbidity는 K<sup>+</sup> 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM에서 각각 0.18, 0.18, 0.165, 0.135의 값을 보여 주었고, half-maximum turbidity에 도달되는 시간은 각각 35초, 54초, 1분 46초, 2분 22초로 농도에 따르는 영향을 뚜렷히 보여 주었다.

Na<sup>+</sup> ion의 경우에서도 (Fig. 2) 거의 같은 결과로서 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM에서 O.D.는 각각 0.18, 0.175, 0.165, 0.14이었으며, half-maximum turbidity에 도달되는 시간도 36초, 58초, 1분 46초, 2분

37초로서  $K^+$ 에 의한 효과와 매우 유사한 값을 보여 주었다.

또한  $K^+$ 과  $Na^+$ 을 함께 superprecipitation system에 첨가하였을 때 즉  $K^+$  60 mM과  $Na^+$  20 mM에서 나타난 O.D.와 half-maximum turbidity에 도달되는 시간은  $Na^+$ 과  $K^+$ 을 각각 80 mM로 처리 하였을 때의 경우와 유사한 값을 보여 주었다(Fig. 3).

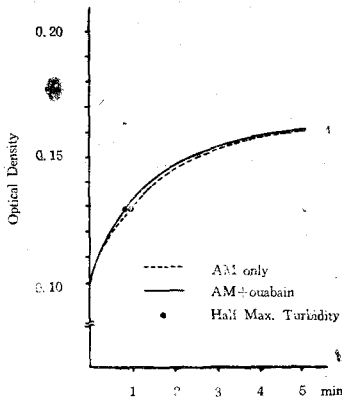


Fig. 4. Effect of ouabain on actomyosin superprecipitation. Medium condition: 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 60 mM KCl, 2 mM ATP,  $10^{-5}M$  ouabain and actomyosin 0.5 mg/ml of reaction mixture. Temp. 25°C

### 2. Ouabain의 superprecipitation에 미치는 영향

$K^+$ 과  $Na^+$ 의 농도를 각각 60 mM로 고정시킨 superprecipitation system에 ouabain  $10^{-5}M$ 을 첨가한 결과  $K^+$ 과  $Na^+$  두 medium 조건에서 모두 ouabain의 영향을 발견치 못하였다(Fig. 4). 즉 maximum turbidity의 O.D.는 모두 0.16이었고 half-maximum turbidity에 도달되는 시간도 ouabain으로 처리한 경우 52초, 처리하지 않은 경우 56초로써 유사한 값을 나타내었다.

### 3. Mitochondria의 superprecipitation에 미치는 영향

superprecipitation system에 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake에 적합한 조건을 맞추고  $K^+$  농도를 60 mM로 고정시켜 ATP로 superprecipitation reaction을 일으킨 결과 mitochondria를 첨가한 superprecipitation system에서 첨가치 아니한 system에서 보다 maximum turbidity도 낮았으며 또한 half-maximum turbidity에 도달되는 시간도 대조 system에 비하여 긴 값을 나타내었다(Fig. 5).

즉 mitochondria를 첨가하지 아니한 system에서의

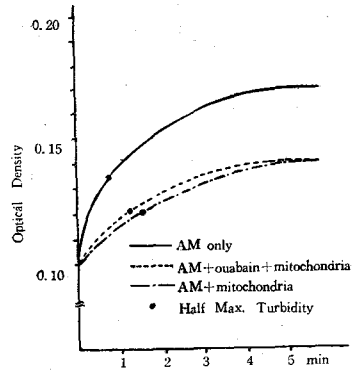


Fig. 5. Effect of mitochondria on actomyosin superprecipitation and influence of ouabain on this effect. Medium condition: 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 60 mM KCl and actomyosin 0.5 mg/ml of reaction mixture. Superprecipitation was initiated with 2 mM ATP after 5 min. incubation with mitochondria, 0.4 mg/ml reaction mixture. 2 mM succinate, 2 mM inorganic phosphate and  $10^{-5}M$  ouabain were also contained.

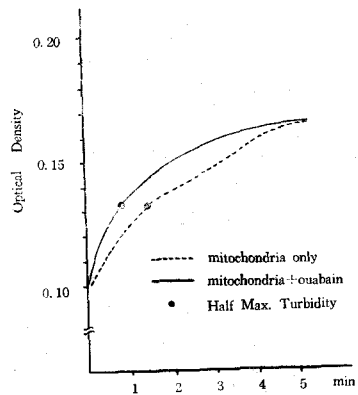
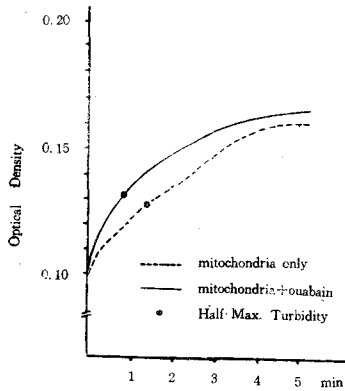


Fig. 6. Effect of ouabain on the suppressed superprecipitation by mitochondria. Medium condition: 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 60 mM KCl,  $10^{-5}M$  ouabain 2 mM succinate, 2 mM inorganic phosphate and actomyosin 0.5 mg/ml of reaction mixture. Superprecipitation was initiated with 2 mM ATP after 5 min. incubation with mitochondria, 0.4 mg/ml of reaction mixture. Temp. 25°C

값은 0.17과 40초의 값을 보여 주었고 mitochondria를 첨가하였을 때의 값은 0.14, 1분 15초를 나타내어 두 값이 모두 대조군에 비해 상이한 값을 보여 주었다.



**Fig. 7.** Effect of ouabain on the suppressed superprecipitation by mitochondria. Medium condition: 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 2 mM  $MgCl_2$ , 60 mM NaCl,  $10^{-5}M$  ouabain, 2 mM succinate, 2 mM inorganic phosphate and actomyosin 0.5 mg/ml reaction mixture. Superprecipitation was initiated by 2 mM ATP after 5 min. incubation with mitochondria, 0.4 mg/ml reaction mixture. Temp.  $25^{\circ}C$

#### 4. Mitochondria의 superprecipitation에 대한 ouabain의 영향

Superprecipitation system에 mitochondria를 첨가하고  $10^{-5}M$ 의 ouabain을 넣은 system과 넣지 않은 것과 비교하였다.

$K^+$  60 mM로 고정시킨 system에 ouabain을 넣었을 때의 curve에서 maximum turbidity의 O.D.는 0.165, half-maximum turbidity에 도달되는 시간은 52초였으며 ouabain이 들어있지 아니한 system에서의 maximum turbidity는 0.165로 같았으나 half-maximum-turbidity에 도달되는 시간이 1분 25초의 값을 보여 주었다 (Fig. 5, 6).

$Na^+$  60 mM로 고정시킨 system에서도 ouabain을 넣었을 경우 0.165, 51초의 값을 나타내고 ouabain을 넣지 아니하였을 때는 0.16, 1분 28초를 보여 줌으로서 (Fig. 7) 모두 ouabain에 의한 영향을 발견할 수 있었다. 그러나 이 같은 영향이  $Na^+$ 과  $K^+$  medium에서 모두 같은 정도의 영향을 보여 줌으로서 ion 종류에 따르는 ouabain의 효과를 발견할 수 있었다.

#### 5. ATP 존재하에서 mitochondria의 $Ca^{++}$ uptake에 의한 ouabain의 영향

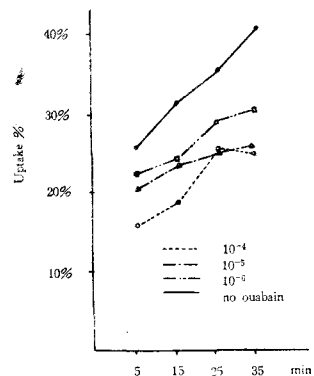
Ouabain의 각 농도에 의한 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake에 미치는 영향을 ATP와 substrate 존재 하에

서 일정한 시간 간격을 두고 측정하였다 (Table 1, Fig. 8). ouabain을 넣지 아니한 대조군에서 5분에 medium에 존재하는  $Ca^{++}$ 의 25.1%를 15분에 31.6%, 25분에 35.5%를 uptake하여 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 35분에는 41.1%의 uptake를 보여 주었다. 시간의 경과에 따라 uptake가 증가하는 양상은 ouabain으로 처리한 group에서도 같은 추세를 보여 주고 있다. 그러나 ouabain 각 농도로 처리한 group과 대조 group의  $Ca^{++}$  uptake를 비교하여 보면 ouabain의 어느 농도에서도 결코 대조군의 uptake %를 넘지 못 하였을 뿐만 아니라 ouabain의 농도가 증가함에 따라 uptake %는 감소되었다. 즉 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake %는 ouabain에 대한 dose-response를 보여 주었다.

대조군의  $Ca^{++}$  uptake를 기준으로 ouabain의 uptake 억제 효과를 percent로 표시하면 (Table 2, Fig. 9)  $10^{-4}M$ 에서 inhibition %는 제일 높았으며,  $10^{-6}M$ 에서 낮

**Table 1.** Effect of ouabain on mitochondrial  $Ca^{++}$  uptake in the presence of ATP. Medium condition: Same as Fig. 8.

Time	Ouabain			
	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	None
5 min	15.9%	20.3%	22.7%	25.1%
15	18.8	23.1	23.3	31.6
25	25.7	24.9	28.9	35.5
35	24.8	25.6	30.6	41.1



**Fig. 8.** Effect of ouabain on mitochondria  $Ca^{++}$  uptake. Medium condition: 3 mM imidazole buffer pH 7.0, 0.25 M sucrose, 5 mM  $MgCl_2$ , 1.5 mM inorganic phosphate, 4 mM succinate, 4 mM ATP, 0.33 mM  $Ca^{++}$  (labeled with  $Ca^{++}$ ), ouabain  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , and  $10^{-6}M$  and mitochondria 1mg/ml of reaction mixture. Total reaction mixture was 5 ml. Temp.  $25^{\circ}C$

은 inhibition %를 보여 줌으로서 역시 dose-response를 나타내었다.

특히  $10^{-5}M$ 에서는 inhibition %가 시간의 경과에 따라 비례적으로 증가하였으며, 25分 이후에는  $10^{-4}M$  때의 억제효과와 유사한 값을 보여 주었다.

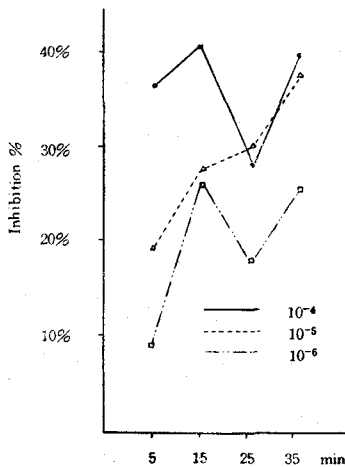
**6. Substrate 존재하에서의 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake에 대한 ouabain의 영향**

ATP 존재없이 substrate 존재 하에서의 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake는 처음 5分에서 15分까지는 uptake가 일어나지만 시간이 경과함에 따라 release가 일어남을 보여 주었다(Table 3, Fig. 10). 즉 5분에 13.9%, 15분에 33.3%로 uptake의 상승을 나타내었지만, 25분에 28.0%, 35분에 20.6%로 감소를 보임으로서 uptake된  $Ca^{++}$ 의 상당한 release를 보여 주었다.

ouabain의 각 농도로 처리한 group에서도 대조군과 같은 경향을 보여 주었음은 물론 대조군의 uptake %와 차이를 발견할 수 없었으며, 또한 ouabain의 각 농

**Table 2.** Inhibitory effect of ouabain on mitochondrial  $Ca^{++}$  uptake. Medium condition: Same as Fig. 8 and 9 and Table 1.

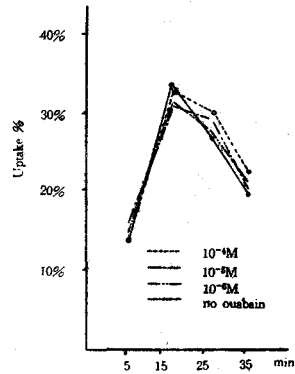
Time	Ouabain			
	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	None
5 min	36.7%	19.1%	9.6%	100%
15	40.5	26.9	26.3	100
25	27.6	29.9	18.6	100
35	39.7	37.7	25.5	100



**Fig. 9.** Inhibitory effect of ouabain on mitochondrial  $Ca^{++}$  uptake. Medium conditions were same as Fig. 8.

**Table 3.** Effect of ouabain on mitochondrial  $Ca^{++}$  uptake in the absence of ATP. Medium conditions were all same as Fig. 10. except the absence of ATP.

Time	Ouabain			
	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	None
5 min	14.6%	15.6%	14.9%	13.9%
15	33.0	31.2	32.8	33.3
25	30.2	29.3	28.8	28.0
35	22.5	20.8	21.3	20.6



**Fig. 10.** Effect of ouabain on mitochondrial  $Ca^{++}$  uptake in the absence of ATP. Medium conditions were all same as Fig. 8 & 9. except the absence of ATP.

도로 처리한 group 사이에서도 차이가 없었다. 즉 dose-response가 나타나지 아니하였다.

**II. 찰**

본 실험에서 medium의 농도와 ion( $Na^+$ 과  $K^+$ )의 종류에 따르는 actomyosin(AM)의 superprecipitation에 미친 영향은, medium의 ion 농도가 증가할 수록 maximum turbidity는 낮아지는 경향을 보여 주었으며, 특히 half-maximum turbidity에 도달되는 시간이 ion의 농도가 증가할 수록 길어졌다. 이와 같은 변화는  $K^+$ 과  $Na^+$  medium에서 같은 결과로 별 차이를 보여주지 아니하였다(Fig. 1, 2, 3).

Levy와 Ryan은<sup>14)</sup>는 AM의  $Mg^{++}$ -activated-ATPase 활성도와 superprecipitation 상태는 서로 correlation을 가진다고 보고하였고, Gergely<sup>15)</sup>, Katz<sup>16)</sup>, Tomura<sup>17)</sup>들은 AM의  $Mg^{++}$ -activated ATPase 활성도는 KCl 농도가 증가함에 따라 감소함을 보고하였다.

본 실험에서는 NaCl medium에서도 KCl medium과

같은 결과를 관찰하였다. 따라서 AM의 superprecipitation은 ion의 종류 보다는 medium의 ionic strength에 영향을 받는 것으로 사료되었으며, mitochondria와 ouabain의 영향을 관찰하기 위한 superprecipitation system에서는  $K^+$ 과  $Na^+$  농도를 60 mM로 고정하였다.

Natural AM은 myosin, actin, tropomyosin, 그리고 troponin으로 이루어져 있으며,<sup>18)</sup> 따라서 이 AM의 superprecipitation은 medium의  $Ca^{++}$  농도에 예민한 영향을 받는 것으로 알려졌다.<sup>18, 19, 20)</sup> 본 실험에서 natural AM의 superprecipitation rate가 mitochondria의 첨가로 낮아짐은 (Fig. 5) mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake로 인한 medium의  $Ca^{++}$  농도 저하에 의한 것으로 생각되었으며, 더욱이 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake 실험에서 (Table 1, Fig. 8) medium의  $Ca^{++}$  양이 5분에서 15분 사이에 25~30%를 uptake한 결과는 이같은 사실에 더욱 확실한 근거를 뒷받침 해 주고 있는 것으로 생각되었다.

Active membrane transport 개념에 의한 mitochondria나 sarcoplasmic reticulum(SR)의  $Ca^{++}$  uptake 과정은 ATP 존재하에서 i)  $Ca^{++}$  binding with membrane carrier ii) transport through the membrane, 그리고 iii) intramembranous storage의 세 단계를 포함하며, 이 과정에서 어느 한 단계 내지 혹은 전 단계에서 ATP를 필요로 할 것으로 생각된다. 그러나 mitochondria나 SR의  $Ca^{++}$  uptake 과정과 mechanism은 상세히 밝혀져 있지 않기 때문에 ATP-dependent binding,  $Ca^{++}$  transport, 혹은  $Ca^{++}$  uptake 등 여러가지 표현으로 사용되고 있다.

따라서 SR과 mitochondria의  $Ca^{++}$ 과의 상호작용에 있어서 CG의 작용은 아직 일치된 의견을 보지 못하고 있으나 적어도 “ATP 존재하에서의 SR에 uptake되는  $Ca^{++}$  양의 변화”라는 의미에서의  $Ca^{++}$  transport mechanism<sup>2, 21)</sup>에 영향을 미치지 아니하며, 이는 mitochondria<sup>22)</sup>나 red cell membrane<sup>23)</sup>의  $Ca^{++}$  transport에서도 같은 결과 임이 보고 되었다.

본 실험에서는 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake에 의해 저하된 superprecipitation이 ouabain에 의해 다시 원상으로 회복됨을 관찰하였고, 이 같은 결과는  $Na^+$ 과  $K^+$  medium에서 별 차이없이 유사한 결과를 보여 주었다. (Fig. 6, 7)

또한 ouabain에 의한 superprecipitation에 별 영향을 발견하지 못하였다. (Fig. 4)

Ouabain이 superprecipitation에 아무런 영향을 미치지 아니 하였음은 CG가  $10^{-4}M$ 에서  $10^{-10}M$  사이에

cardiac AM의  $Mg^{++}$  혹은  $Ca^{++}$  activated ATPase 활성화도에 영향을 미치지 않는다는 Katz<sup>24)</sup>의 보고와 일치하여 이러한 결과는 본 실험에서 mitochondria의 superprecipitation에 대한 ouabain의 영향을 판단하는데 ouabain 자체의 superprecipitation에 미친 효과를 배제할 수 있었다.

Repke<sup>25)</sup>는 myocardium의  $Ca^{++}$  양은  $Na^+$  transport의 억제에 의하여 이차적으로 조절된다고 보고하였다. 즉 CG의 Na-stimulated ATPase<sup>26)</sup>에 대한 억제 결과 세포 내의  $Na^+$ 의 농도는 증가되고, 증가된  $Na^+$ 은 binding site에  $Ca^{++}$ 과 경쟁을 일으켜 subcellular structure로부터 bound calcium을 유리시킨다고 보고하였다. 이같은 양이온의 경쟁 현상은 microsomal fraction<sup>9)</sup>과 mitochondria<sup>10)</sup>에서도 일어남이 보고 되었다.

그러나 본 실험의 mitochondria에 의해 억제된 superprecipitation이 ouabain에 의해 reverse 되었음은  $Na^+$ 과  $K^+$  medium에서 모두 발견할 수 있었으며, 그 reverse 정도에 또한 차이를 발견할 수 없었다. (Fig. 6, 7) 이러한 결과는 medium의  $K^+$ 을  $Na^+$ 으로 대체 시킴으로써 cardiac SR의  $Ca^{++}$  binding에 별 영향을 미치지 못한다는 보고<sup>27)</sup>와 유사한 결과라고 해석되었다.

또한 본 실험에서는 ATP 존재 하에서 mitochondria의  $Ca^{++}$  uptake는 ouabain에 의해 억제됨을 나타내고 있다. (Table 1, Fig. 8) ouabain으로 처리된 group은 대조군에 비하여 훨씬 낮은 uptake %를 보여 주었으며 그 정도에 있어서 dose-response를 나타내었다.

즉 ouabain의 농도가 증가함에 따라 uptake 억제는 증가하였으며 (Table 2, Fig. 9),  $10^{-4}M$ 에서 최고 40.5%의 억제를 보여 주었으며, 특히  $10^{-5}M$ 에서는 시간의 경과에 따라 억제 정도가 비례적으로 증가함을 보여 주었다. 따라서 mitochondria에 의해 억제된 superprecipitation이 ouabain에 의해 reverse된 mitochondria의 ATP-dependent  $Ca^{++}$  uptake가 ouabain에 의하여 억제된 때문이라고 사료되었다.

세포내에서  $Ca^{++}$ 의 distribution과 metabolism에 대한 CG의 작용에는 아직도 의견의 일치를 보지 못하고 있지만 CG는 “ATP 존재 하에서의 uptake되는  $Ca^{++}$  양의 변화”라는 의미에서의  $Ca^{++}$  transport mechanism에 영향을 미치지 아니하며, CG는 SR<sup>2)</sup>, mitochondria<sup>22)</sup>그의 cell membrane<sup>23)</sup>등에 대한  $Ca^{++}$  binding의 character에 변화를 주어 free- $Ca^{++}$  fraction을 증가시키는  $Ca^{++}$  releasing effect로 inotropic action의 기전이 설명되고 있다.

그러나 본 실험에서는 ATP가 존재하지 않는 medi-

um 에서 mitochondria 의 uptake 는 처음 uptake 후 시간의 경과에 따라 다시 release 를 나타내었고 이와 같은 mitochondria 와  $Ca^{++}$ 의 상호작용에 ouabain 은 별 영향을 미치지 아니하였다. (Table 3, Fig. 10)

이상의 열거한 실험적 근거로 미루어 보아 mitochondria 의  $Ca^{++}$  transport 과정에서 확실히 어느 단계에 작용한다고 말할 수는 없지만 mitochondria 의  $Ca^{++}$  release 에 대한 작용보다는 ATP 존재하에서의  $Ca^{++}$  uptake 에 더욱 뚜렷한 작용을 미치는 것으로 사료되었으며, ouabain 의 mitochondria 에 대한 이와 같은 작용은 이 약물의 inotropic action 의 기전의 한 요인임을 추측케 하였다.

### 결 론

1) 개심장 mitochondria 의  $Ca^{++}$  uptake 에 미치는 ouabain 의 영향을 관찰하였다.

2) Superprecipitation 의 혼탁도 증가율은 ionic strength 에 의해 영향을 받고 ion의 종류( $Na^+$  혹은  $K^+$ )에 의한 영향은 없었다.

Ionic strength 가 높으면 혼탁도의 증가율은 감소되고 ionic strength 가 낮으면 혼탁도의 증가율은 상승하였다.

3) Superprecipitation 의 혼탁도 증가율에 ouabain 의 영향은 발견할 수 없었다.

4) Mitochondria 는 superprecipitation 의 혼탁도 증가율을 감소시켰고

Mitochondria 에 의해 저하된 superprecipitation 은 ouabain 에 의해 회복되었다.

이 회복정도는  $Na^+$ 과  $K^+$  medium 에서 같은 효과를 보여 차이를 발견할 수 없었다.

5) ATP 존재하에서 mitochondria 의  $Ca^{++}$  uptake 는 ouabain 에 의해 억제되었고, 이 억제 정도는 ouabain 의 농도가 증가함에 따라 증가하였다.

6) ATP 가 존재하지 않은 경우의 mitochondria 의  $Ca^{++}$  uptake 는 초기에는 uptake 를 하였으나 시간이 경과함에 따라  $Ca^{++}$ 의 release 를 나타냈고, 이 uptake 와 release 에 ouabain 은 영향을 미치지 아니 하였다.

7) Ouabain 의 mitochondria 에 미친 작용으로 인한 세포내  $Ca^{++}$  이동은 ATP 존재에 의한  $Ca^{++}$  uptake 의 억제에 의한 것으로 사료되었다.

(방사성동위원소 측정에 협조하여 주신 원자력의학연구소 이장규 소장님과 위생연구실 여러분께 심심한 감사사를 드립니다.)

### REFERENCES

- 1) Bailey, L.E. and Dresel, P.E.: *Correlation of contractile force with  $Ca^{++}$  pool in the isolated heart.* *J. Gen. Physiol.*, 52:969-982, 1968.
- 2) Lee, K.S.: *The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.* *Pharma. Rev.*, 23: p. 234, 1971.
- 3) Grossman, A. and Furchgott, R.F.: *The effect of various drugs on  $Ca^{++}$  exchange in the isolated guinea pig left atrium.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 145:162-172, 1965.
- 4) Sandow, A.: *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.* *Pharmacol. Rev.*, 17:265-320, 1965.
- 5) Lee, K.S.: *Relations of cations to the inotropic and metabolic actions of cardiac glycosides.* *Pergamon Press.*, 3:185-201, 1963.
- 6) Lee, K.S., Yu, D.H. and Struthers, J.J.: *A study on the effect of cardiac glycosides on the syneresis of myofibrils in the presence of relaxing factor.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 148: 277-283, 1965.
- 7) Lee, K.S., Shin, M.R., Kang, D.H. and Chan, K.K.: *Studies on mechanism of cardiac glycosides action.* *Biochem. Pharmacol.*, 19:1055-1059, 1969.
- 8) Lee, K.S., Tanaka, K. and Yu, D.H.: *Studies on the adenosine triphosphatase, calcium uptake and relaxing activity of the microsomal granules from skeletal muscle.* *J. Physiol.*, 179:456-478, 1965.
- 9) Lee, K.S., and Choi, S.J.: *Effect of the cardiac glycosides on the  $Ca^{++}$  uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 153:114-120, 1966.
- 10) Vasington, F.D. and Murphy, J. V.:  *$Ca^{++}$  uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation.* *J. Biol. Chem.*, 237:2670-2677, 1962.
- 11) Brierley, G.P., Murer, E. and Green, D.E.: *Participation of an intermediate of oxidative phosphorylation in ion accumulation by mitochondria.*



- dria., 140:60-62, 1962.
- 12) Lehninger, A.L.: *Biochemistry*. Worth Publishers, INC. p. 595, 1970.
  - 13) Ebashi, S.: *Actomyosin superprecipitation*. *J. Biochem.*, 50:77-78, 1961.
  - 14) Levy, H.M. and Ryan, E.M.: *Evidence that the contraction of actomyosin requires the relation of ATP and  $Mg^{++}$  at 2 different sites*. *Biochemische zeitschrift*, 345:132-147, 1966.
  - 15) Maruyama, K. and Gergely, J.: *Interaction of actomyosin with adenosine triphosphate at lower ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 273: 1100-1106, 1962.
  - 16) Katz, A.M.: *Influence of tropomyosin upon the reaction of actomyosin at lower ionic strength*. *J. Biol. Chem.*, 239:3304-3311, 1964.
  - 17) Tonomura, Y. and Yoshimura, J.: *Inhibition of myosin B-adenosine triphosphatase by excess substrate*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 90:73-81, 1960.
  - 18) Weber, A.: *On the role of  $Ca^{++}$  in the activity of ATP hydrolysis by actomyosin*. *J. Biol. Chem.*, 234:2764-2769, 1959.
  - 19) Ebashi, S.: *Third component participating in the superprecipitation of natural actomyosin*. *Nature.*, 200:1010, 1963.
  - 20) Katz, A.M.: *Purification and properties of a tropomyosin-containing protein fraction that sensitizes reconstituted actomyosin to calcium binding agents*. *J. Biol. Chem.*, 241:1522-1592, 1969.
  - 21) Klaus, W. and Lee, K.S.: *Influence of cardiac glycosides on  $Ca^{++}$  binding in muscle subcellular components*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 166: 68-76, 1969.
  - 22) Lee, K.S., Hong, S.A. and Kang, D.H.: *Effect of cardiac glycosides on interaction of  $Ca^{++}$  with mitochondria*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172: 180-187, 1969.
  - 23) Lee, K.S. and Shin, B.C.: *Studies on the active transport of  $Ca^{++}$  in human red cells*. *J. Gen. Physiol.*, 54:713-729, 1969.
  - 24) Katz, A.: *Absence of effect of cardiac glycosides on cardiac myosin and a  $Ca^{++}$  sensitive reconstituted cardiac actomyosin*. *J. Pharmal. Exp. Ther.*, 154:558-565, 1966.
  - 25) Repke, K.: *Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis*. *Klin. Wochensh.*, 42:157-165, 1964.
  - 26) Skou, J.C.: *Enzymatic basis for active transport of  $Na^+$  and  $K^+$  across the cell membrane*. *Physiol. Rev.*, 45:596-617, 1965.
  - 27) Otsuka, M. and Nomomura, Y.: *The influence of ouabain on the reaction between membrane potential and tension in frog heart muscle*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 141:1-5, 1963.
  - 28) Ebashi, S., Kodama, A. and Ebashi, F.: *Tropo-nin*. *J. Biochem.*, 64:465-477, 1968.