

附子「부타놀」分劃이 心筋 收縮蛋白質에 미치는 影響

서울대학교 醫科大學 外科學教室

梁 吉 承 · 朴 吉 秀

서울대학교 藥理學教室

朴 贊 雄 · 林 定 圭

=Abstract=

Effect of Aconiti tuber butanol fraction on the contractile proteins of myocardium

Kil Sung Yang and Kil Soo Park

Department of General Surgery, College of Medicine, Seoul National University

Chan Woong Park and Jung Kyoo Lim

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Aconiti tuber butanol fraction has been recently known to have stimulatory effect on myocardial contractility. In the present study, the possibility that the Aconiti tuber butanol fraction acts directly on contractile proteins of myocardium has been investigated using natural actomyosin extracted from dog heart.

It revealed that Aconiti tuber butanol fraction in concentrations from 10^{-2} ~ 10^{-7} gm/ml had no stimulatory effect on either the Mg^{+} or Ca^{+} -activated adenosinetriphosphatase activity of cardiac actomyosin. And no direct Ca^{+} -like action of the drug on cardiac actomyosin was also found.

Aconiti tuber butanol fraction in concentrations above 10^{-4} gm/ml, however, was somewhat stimulatory on superprecipitation of actomyosin and markedly inhibited the membrane bound Na^{+} - K^{+} -activated ATPase activity.

In these connections, the positive inotropic action of Aconiti tuber butanol fraction on myocardium thus does not seem to reflect a direct interaction with contractile proteins, but the drug seem to stimulate myocardial contractility through the actions on the membrane transport of Ca^{+} .

I. 緒 論

성탄화과에 속하는 植物인 附子(Aconiti tuber)의 에타놀추출물 중에서 aconitine, mesaconitine, mesaconine 등 알카로이드 성분을 제거한 $CHCl_3$ 不溶性物質이 적출개구리심장에서 強力한 強心作用을 나타낸다고 矢數(1958)가 보고한 바 있다. 金(1973)은 이 $CHCl_3$ 不溶性物質을 다시 물과 n-butanol 에 分配시켰을 때 強心作用을 나타내는 物質이 n-butanol 로 移行되었으며 그의 強心作用이 보다 增強됨을 관찰하였으며 그이후

洪등(1975)은 이 附子「부타놀」분획물이 가토의 적출 좌심방표본에서 기존 digitalis 強心配糖體의 一種인 ouabain 과 유사한 收縮張力の 增加를 나타냄을 보고하였다.

윤(1976)은 고양이 心室 乳頭筋의 等長性 및 等力性 收縮에 있어서 張力の 發生速度 및 그 크기가 부자「부타놀」분획물에 의하여 增加될 뿐 아니라 最大張力에 의 도달시간 및 總收縮에 所要되는 時間은 短縮됨을 觀察하고 이러한 현상은 부자「부타놀」분획이 A.V. Hill(1924, 1938)의 筋收縮機構 模型중 能動的 收縮部分(active contractile element)에 直接的으로 作用하

으로서 이 部分의 收縮速度 및 張力發生을 增加시킨 결과일 것으로 推定하고 이로부터 筋收縮機構에서의 에너지 發生能力과 그 이용에 부자「부타늘」분획이 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있음을 시사하였다. 한편 申 등(1976)은 心臟筋 microsomal $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -activated ATPase 에 對한 영향을 관찰한 실험에서 역시 ouabain 과 類以한 양상으로 그 活性度를 抑制하였으며 따라서 부자「부타늘」분획물은 細胞膜에서 ATPase 에 영향을 미치므로서 細胞內外의 이온構成에 變化를 야기하고 그 결과 筋收縮의 excitation-contraction coupling 에서 重要한 役割을 하는 細胞內 유리 Ca^{2+} 농도를 增加시킬 수 있을 것으로 推定하였다.

이상에서 附子「부타늘」분획물은 心筋纖維이하의 構造物에 對한 作用 결과 筋收縮蛋白인 actin 과 myosin 의 相互連結을 促進시키므로서 心筋收縮의 增強現象을 나타낼 수 있는 것으로 사료되어 본 연구에서는 일차적으로 筋收縮蛋白 複合體인 actomyosin 의 superprecipitation 과 ATPase 活性에 對한 附子「부타늘」분획물의 영향을 관찰하였다.

II. 實驗方法 및 材料

1. 附子「부타늘」분획

부자「부타늘」분획(이하 ABF 라 칭함)은 草烏頭(Aconitum volubile pallas var pubescens Regel)를 金(1975)의 方法으로 Fig. 1에서와 같이 처리하여 얻

었다.

이때 에타놀추출물은 1% Na_2CO_3 또는 NH_4OH 로 알칼리성으로 한후 Mayer's reagent 에 음성일때까지 CHCl_3 로 진탕 세척하여 알칼로이드성분을 제거하였으며 최종 부타놀이행 부분을 減壓蒸溜하고 그 잔유물을 冷凍乾固시킨후 使用하였다.

2. Cardiac actomyosin

成犬을 體重 kg 당 30 mg 의 pentobarbital Na 으로 마취하여 失血致死시킨 후 即時 심장을 적출하여 心房은 제거하고 心室筋에서 Ebahi(1961)의 方法으로 Edsell-Weber Solution (0.6M KCl, 0.01M Na_2CO_3 , 0.04M NaHCO_3)으로 24시간동안 추출하여 natural actomyosin (actin, myosin, tropomyosin 및 troponin 복합체)을 얻었다. Actomyosin 의 最終 KCl 濃度を 0.6M 로 하여 同量의 glycerol 과 混合 -20°C 에 保管하였으며 實驗에 使用시는 저장 actomyosin 1 vol.에 9 vol.의 세척액(0.05M KCl, 0.005M Na_2EDTA buffered with tris to pH 7.0)을 가하여 14,000×g 20분간 원심세척하고 다시 實驗에 使用되는 反應液과 동일한 완충용액으로 14,000×g 20분동안 2次 원심세척하여 實驗에 供與하였다. 상기 造作은 모두 4°C 에서 行하였다.

3. Microsomal ATPase

成熟 家兔를 頭部에 타격을 加하여 失血致死시킨 후

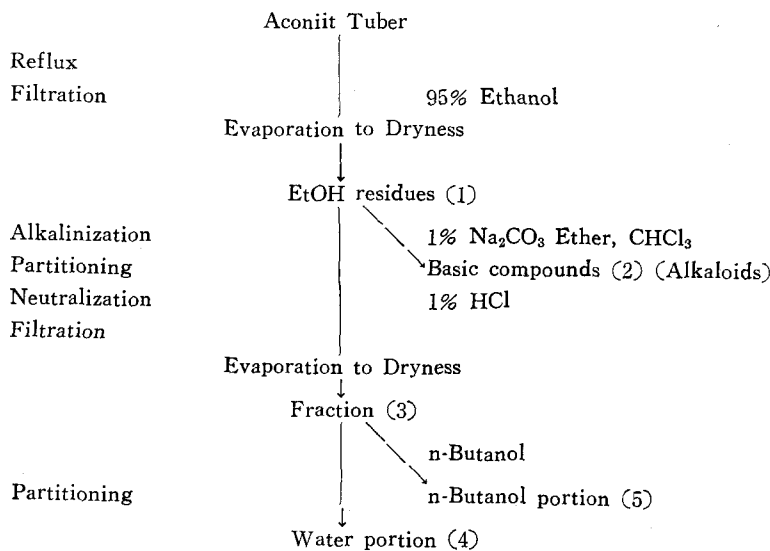


Fig. 1. Flow chart for extraction of Aconiti Tuber butanol fraction.

左心室을 적출해내고 1mM EDTA 를 함유한 等張性 sucrose-용액에서 homogenation 하여 Matsui 및 Schwartz(1966) 方法으로 분리하였다.

4. Actomyosin superprecipitation

0.06M KCl, 20mM Tris-maleate pH 6.8을 기본으로 하는 반응용액에 1mg/ml의 actomyosin gel suspension 을 만들었다.

실험결과에서 지시하는 농도로 Mg²⁺, Ca²⁺ 및 ABF 를 첨가하여 25°C 에서 5분동안 preincubation 한후 1mM ATP 를 첨가하므로써 superprecipitation 을 개시시켰다. Superprecipitation 정도는 Hitachi-Perkin-Elmer spectrophotometer Model 139에 Sargent linear-log gear recorder 와 automatic cell positioner 를 연결하여 ATP 첨가후부터 나타나는 반응 actomyosin suspension 의 經時的인 optical density 變化를 파장 550m μ 에서 연속 記錄하므로써 測定하였다.

5. ATPase actyity

Actomyosin ATPase 활성도는 superprecipitation 반응조건과 같은 상황에서 ATP 1mM 을 첨가후부터 3분동안 25°C 에서 incubation 하고 유리되는 無機磷 (Pi)을 Taussky 및 Shorr(1953)의 方法으로 測定하였다.

Microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase 活性도는 1 mM Tris EDTA, 50mM Tris buffer pH. 7.4에 Na⁺ 및 K⁺을 각각 100mM, 10mM 로 고정한 반응액에 蛋白質量으로 150 μ g 의 microsomal fraction 과 ATP 2.5 mM 을 加하여 20분동안 incubation 한후 유리되는 Pi 를 測定하였다.

여기서 ATP 는 Na₂ ATP 를 50w- \times 8 양이온 교환수지로 처리한후 pH 6.8이 될때까지 Tris-salt 를 加하여 Tris-ATP 로 만들어 사용하였다.

III. 實驗結果

1. Actomyosin Superprecipitation 에 미치는 영향

KCl 0.06M 의 기본반응액에 Mg²⁺ 1mM, Ca²⁺ 5 \times 10⁻⁷M 을 加한 반응조건(25°C)에서 Ebashi 의 natural actomyosin 1mg/ml 가 1mM ATP 에 의하여 유도되는 superprecipitation 의 정도 및 시간경과에 따른 變化를 측정하였다.

附子「부타놀」 분획은 심근 actomyosin 의 superpre-

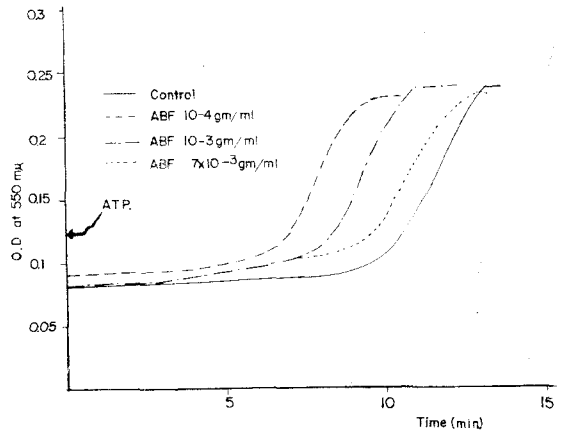


Fig. 2. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on superprecipitation of cardiac actomyosin. Reaction mixture contained; 60mM KCl, 20mM Tris-maleate pH 6.8, 1mM Mg²⁺, 5 \times 10⁻⁷ Ca²⁺, 1mM ATP, 1mg/ml Actomyosin in a total volume of 3ml at 25°C. At arrow ATP was added.

cipitation 을 대조에 비해 빨리 일으키고 clearing 을 短縮시켰다. Fig. 2에서와 같이 ABF 를 첨가하지 않은 對照에서는 ATP 첨가후 약 10분에서 부터 superprecipitation 이 開始되었으나 ABF 10⁻⁴ gm/ml 에서는 superprecipitation 의 開始가 短縮되어 약 7분에 나타나서 clearing phase 가 짧아졌다. 그러나 ABF 의 농도를 증가하여 10⁻³ gm/ml 이상일때에는 對照에 비해서는 superprecipitation 이 빨리 開始되었으나 10⁻⁴ gm/ml 보다는 오히려 지연되었다. 한편 maximum superprecipitation 의 程度는 ABF 에 의하여 영향을 받지 않고 대조와 동등하였다.

II. Actomyosin ATPase 에 미치는 영향

Ca²⁺-sensitive natural actomyosin 의 ATPase 活性도에 대한 ABF 의 영향을 관찰하였다.

Superprecipitation 測定에서와 같은 기본 반응액에 유리 Ca²⁺濃도를 0M~10⁻⁷M 까지 變化시키면서 Ca²⁺ 농도에 따른 ABF 의 영향을 먼저 관찰하였다. 이때 반응액의 유리 Ca²⁺濃도는 Ca²⁺ chelator 인 EGTA 첨가에 의하여 조절하였으며 EGTA 첨가량은 Katz (1970)에 의하여 유도된 公式을 적용하여 정하였다. 유리 Ca²⁺濃도가 증가함에 따라 심근 actomyosin 의 ATPase 活性도는 증가를 보였으며 이때 ABF 의 첨가

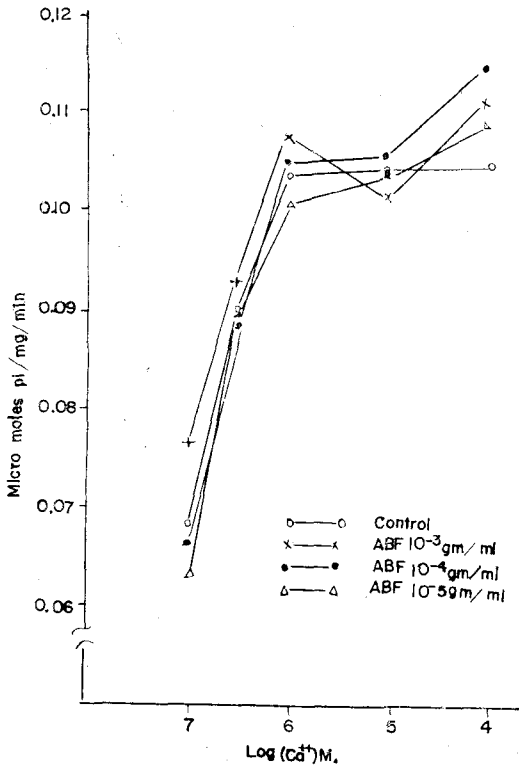


Fig. 3. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on the cardiac actomyosin ATPase activity as a function of Ca⁺⁺. Incubation medium; 60mM KCl, 20mM Tris-maleate pH 6.8, 1mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mg/ml Actomyosin at 25°C.

는 10⁻⁴~3×10⁻³gm/ml의 濃度에서 약간 活性化를 增加시키는 傾向을 보이나 유의 하지는 못하였으며 10⁻² gm/ml의 高濃度에서는 오히려 抑制 傾向을 보였으나 역시 의미있는 차이는 못되었다(Fig. 3, 4, 5).

반응액중 Mg⁺⁺을 첨가하지 않은 상황에서 Ca⁺⁺-activated ATPase의 活性化를 測定한 바 역시 ABF 10⁻⁴gm/ml 이상의 高濃度에서 약간의 活性化 增加를 보였으나 유의 하지는 못하였다(Fig. 6).

반응시간 경과에 따라 actomyosin ATPase에 의한 ATP 분해율을 측정한 바 Fig. 7에서와 같이 actomyosin superprecipitation의 clearing phase에 해당하는 10분까지의 ATPase 活性化 및 superprecipitation 개시후의 ATP 분해에 대하여 ABF 각 농도는 첨가전에 비하여 의미있는 增減을 나타내지는 못하였다.

III. Microsomal ATPase 에 대한 영향

Na⁺ 100mM, K⁺ 10mM 로한 조건에서 家兔心筋의

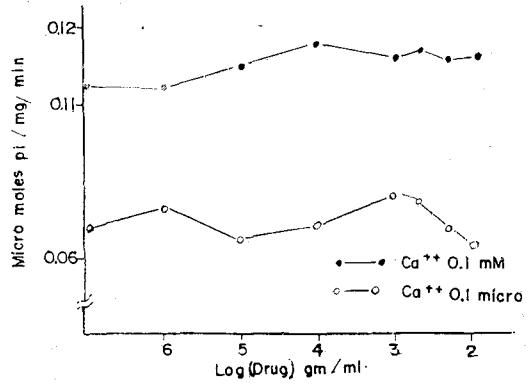


Fig. 4. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on the Mg⁺⁺-activated cardiac actomyosin ATPase activity in the presence of Ca⁺⁺. Incubation medium; same as in Fig. 3.

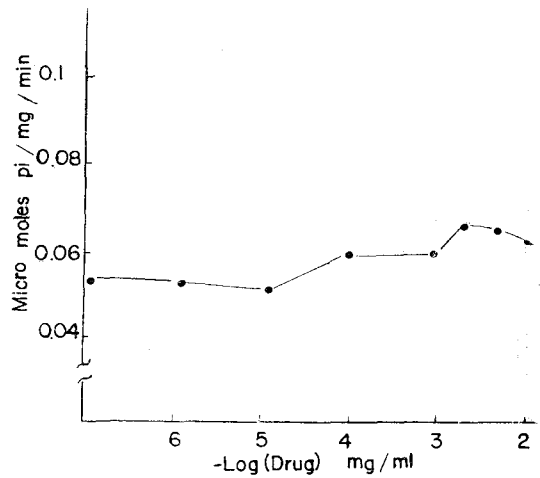


Fig. 5. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on the Mg⁺⁺-activated cardiac ATPase activity in the absence of Ca⁺⁺. Incubation medium; same as in Fig. 3.

membrane Na⁺-K⁺-activated ATPase 活性化는 ABF에 의하여 抑制되었으며 濃度增加에 따라 抑制 정도가 현저하였다. Table 1에서와 같이 ABF 10⁻⁶gm/ml에서는 억제가 경미하나 농도증가에 따라 억제가 심하여 약 4×10⁻³gm/ml에서 50% 억제를 나타내었다.

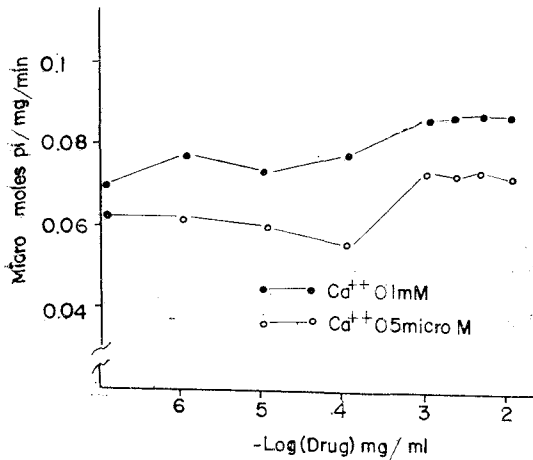


Fig. 6. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on the Ca⁺⁺-activated cardiac actomyosin ATPase activity in the absence of Mg⁺⁺. Incubation medium; 60mM KCl, 20mM Tris-maleate pH 6.8, Ca⁺⁺ 0.1mM or 0.5 μM, 1mM ATP, 1mg/ml Actomyosin at 25°C.

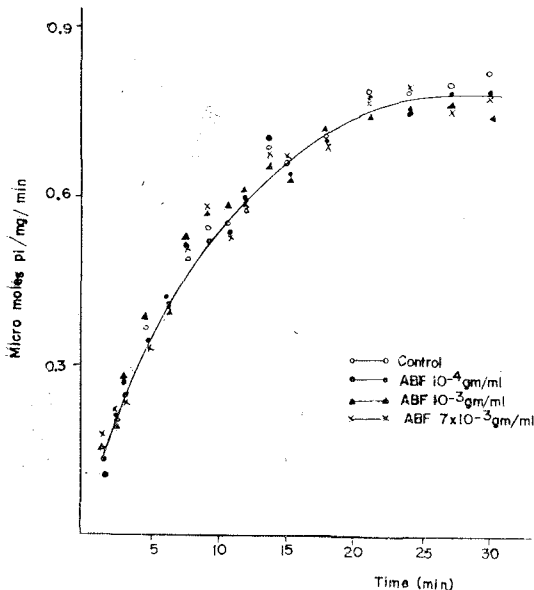


Fig. 7. Effect of Aconiti Tuber Butanol Fraction on the rate of ATP hydrolysis by cardiac actomyosin in the presence of 5×10⁻⁷M Ca⁺⁺. Incubation medium; 60mM KCl, 20mM Tris-maleate pH 6.8, 1mM MgCl₂, 0.5 μM Ca⁺⁺, 1mM ATP, 1mg/ml Actomyosin at 25°C.

Table 1. Effect of Aconiti tuber Butanol fraction on the cardiac microsomal Na⁺-K⁺-activated ATPase

ABF. (gm/ml)	Specific activity (μmoles Pi/mg. protein)
None	1.73±0.105
10 ⁻⁶	1.60±0.10
10 ⁻⁵	1.56±0.06
10 ⁻⁴	1.59±0.045
10 ⁻³	1.50±0.075
3×10 ⁻³	1.1 ±0.075
7×10 ⁻³	0.74±0.045
10 ⁻²	0.23±0.050

Average of 8 experiments±S.E. Incubation medium: 1mM Tris-EDTA, 50mM Tris pH 7.4, 100mM Na⁺, 10mM K⁺, 2.5mM ATP, 150μg prot. of microsomal fraction. 37°C for 20 min.

IV. 考 察

Actomyosin ATPase 活性은 筋收縮蛋白 actin과 myosin 의 相互結合 程度를 反映해 주는 指標로서 ATPase 活性의 抑制는 actin-myosin 結合의 解離를 반대로 活性의 增加는 actin-myosin 의 強한 結合을 意味한다.

이러한 事實은 actomyosin 의 여러가지 物理化學的 性質의 變化를 觀察한 實驗들에서 밝혀져 있는 바(Katz 1970) actomyosin 이 不溶性인 gel 의 狀態로 있는 低濃度의 鹽溶液에서 actomyosin gel 은 Mg⁺⁺ 존재하에서 ATP 의 첨가로 처음에는 actin-myosin 間의 解離를 일으켜서 混濁度가 減少하는 소위 clearing 을 초래하나 잇따라 ATP 가 actomyosin ATPase 에 의하여 분해되므로서 ATP 농도가 저하하는 것과 더불어 gel 의 混濁度는 다시 增加하면서 superprecipitation 이 나타난다. 이러한 superprecipitation 은 actomyosin gel 에서 脫水가 일어나면서 오므라들기 때문에 나타나는 現象으로 actin-myosin 의 強한 結合을 말해 주는 것으로서 筋收縮의 試驗管内 모델로 널리 認定되고 있다(Szent-Gyorgi 1947). 따라서 superprecipitation 程度는 actomyosin ATPase 活性과 密接한 關係를 갖기 마련이며 ATPase 活性을 抑制하는 因子들은 clearing 을 延長하고(Katz 1964, 1970) 반대로 superprecipitation 중에는 ATP 분해가 촉진됨이 알려져 있다(Yasui et al 1965).

임상에서 사용되고 있는 強心配糖體들은 心筋에 대

한 直接作用으로 心收縮을 增強시키는 것으로 알려져 있으나 이의 作用機轉은 아직 確實히 밝혀져 있지 못하며 특히 그 機轉으로 이 配糖體가 心筋收縮蛋白質을 直接的으로 促進할 것이라는 것에 대해서는 異論이 많으나 대체적으로는 否定的인 結論이 많다. Edman (1950) Stowring et al(1966) Jacobson(1968) 등은 ouabain 이 心筋 actomyosin 의 ATPase 活性 및 superprecipitation 을 促進시킨다고 보고한 반면 Benson (1955) Katz(1966), Luchi et al(1967) 鄭등(1972)은 digitalis 强心配糖體는 心筋收縮蛋白質에 대하여 직접적인 促進作用은 없다고 主張하고 있다. 특히 Katz(1966)은 純粹한 actin 과 myosin 을 再結合시켜 얻은 Ca^{++} -sensitive reconstituted actomyosin 의 ATPase 活性 및 superprecipitation 을 ouabain 이 전혀 증가시키지 못하며 Ca^{++} 에 의한 ATPase 活性의 促進에 대해서도 영향을 미치지 않는다고 하면서 digitalis 强心配糖體는 心筋收縮蛋白質을 직접적으로 촉진하기 보다는 sarcoplasmic reticulum 을 포함한 세포막에서의 Ca^{++} transport 에 一次的으로 영향을 미치므로서 간접적인 筋收縮蛋白質의 促進이 招來될 것이라고 보고하였다. 또한 Lee et al(1969, 1970, 1971)등도 digitalis 配糖體의 作用機轉으로 Ca^{++} 의 membrane transport 에 대한 영향을 중요시하고 있어서 digitalis 配糖體에 의한 세포막 Na^+K^+ ATPase 活性의 抑制와 sarcoplasmic reticulum 또는 mitochondria 에서의 Ca^{++} 유리의 증가가 세포내 Ca^{++} 농도를 증가시키고 이로 인해 心筋收縮이 增加한다고 主張하고 있다.

最近 현저한 心筋收縮增強作用이 알려져 있는 부자「부타놀」분획은 그 作用樣狀이 digitalis 强心配糖體와 유사함이 보고되고 있으나(洪 1975, 윤 1976, 申 1976) 그 機轉은 明確히 究明된 바가 없기 때문에 筋收縮蛋白質에 대한 直接的인 促進作用도 전혀 배제할 수가 없었다. 따라서 본 연구에서는 actomyosin 에 대한 부자「부타놀」분획의 직접적인 영향을 觀察한 바 actomyosin 의 ATPase 活性에 대한 영향에 있어서는 Fig. 3, 4, 5에서와 같이 否定的인 결과를 얻었으며 actomyosin 과 Ca^{++} 의 상호작용에 부자「부타놀」분획이 促進的인 可能性, Ca^{++} 과 비슷한 作用을 할지도 모른다는 可能性 또한 실험결과(Fig. 3, 4, 5)에서 회박하였다. 단지 부자「부타놀」분획은 Fig. 2에서와 같이 superprecipitation 을 약간 促進하고 clearing 을 短縮시키는 현상을 관찰하였으나 그러나 이와같이 superprecipitation 의 빠른 開始는 actomyosin 의 ATP 분해를(Fig. 7)과는 부합되지 않는 현상이었다. 한편 세포막 Na^+K^+ -

activated ATPase 活性에 대하여는 부자「부타놀」분획이 현저한 억제를 나타내고 있는 바 (Table 1)이는 申 (1976)의 보고와 일치하는 것이었으며 digitalis 强心配糖體에서와 같이 Ca^{++} 의 membrane transport 에 「부자「부타놀」분획이 영향을 미쳐서 세포내 유리 Ca^{++} 을 증가시키고 心筋收縮을 增強시킬 수 있다는 可能性을 더욱 인정케하였다. 이와 관련하여 생각해볼 때 actomyosin ATPase 活性의 增加없이 superprecipitation 이 촉진된 현상은 본실험에 使用한 actomyosin 이 순수한 actin 과 myosin 으로 再構成하여 만든 two-protein system 이 아닌 natural actomyosin 이기 때문에 추출과정중에 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 기타 membrane fragment 가 소량이나마 混存될 可能性을 생각할 수도 있으므로(Katz 1970) 이러한 membrane fragment 에 대한 부자「부타놀」분획의 작용을 인정한다면 digitalis 强心配糖體에서와 같이 sarcoplasmic reticulum 또는 mitochondria 로 부터의 미량이나마 Ca^{++} 유리가 일어나는 것이 원인이 될지도 모르겠다.

V. 要 約

最近 현저한 心筋收縮增強作用이 알려져 있는 부자「부타놀」분획의 作用機轉을 究明코저 하는 試圖의 일환으로 心筋收縮蛋白質에 대한 직접적인 영향을 관찰하였다.

부자「부타놀」분획은 actomyosin ATPase 活性에 대하여 別 영향을 미치지 않았으며 actin-myosin 相互結合에서 Ca^{++} 과 유사한 역할을 나타내지도 못했다. 단 actomyosin 의 superprecipitation 에 대하여는 약간 促進的이었으나 이러한 작용은 actomyosin ATPase 活性의 증가를 동반치 못했다. 그러나 microsmal Na^+K^+ -activated ATPase 活性는 현저히 억제하였으며 이러한 현상은 부자「부타놀」분획이 Ca^{++} 의 membrane transport 에 영향을 미칠것으로 인정되는 사실로서 부자「부타놀」분획의 心筋收縮增強作用機轉의 일부는 筋收縮蛋白質에 대한 직접작용보다는 extracellular 또는 intracellular membrane 에서의 Ca^{++} 이동에 영향을 미쳐 세포내 유리 Ca^{++} 농도를 증가시키는 것이 간접적으로 心筋收縮을 促進시킬 것으로 사료되었다.

參 考 文 獻

김광철, 홍사악, 박찬용: 부자에서의 강심작용 물질 검색에 관한 연구. 최신의학 16(12), 1393.

- 1973.
- 失數四郎: 日本藥理學 雜誌 54, 880, 1958.
- 신상구, 이천규, 박찬웅, 김명석: 부자 Butanol fraction이 카트 심장근 microsomal Na^+K^+ -activated ATPase 활성도에 미치는 영향, 대한약리학잡지, 12(1), 12, 1976.
- 윤 충: 수중 강심약물과 부자 부타놀 분획이 심장근의 기계적 성질에 미치는 영향. 대한약리학잡지, 12(1), 1, 1976.
- 정명희, 박찬웅, 홍사악: Ouabain이 Ca^{++} -troponin 상호작용에 미치는 영향. '서울의대잡지. 13, 261, 1972.
- 홍사악, 박찬웅, 김명석, 신상구: 부자 Butanol fraction의 강심작용에 관한 연구, 대한약리학잡지. 11(1), 1, 1975.
- Benson, E.S.: Composition and state of protein in heart muscle of normal dogs with experimental myocardial failure. *Cir. Res.*, 3, 221, 1955.
- Ebashi, S.: Calcium binding activity of vestibular relaxing factor. *J. Biochem (Tokyo)*, 50, 286, 1961.
- Edman, K.A.P.: The action of ouabain on heart actomyosin. *Acta. Physiol. Scand.*, 21, 230, 1950.
- Hill, A.V., Gasser, H.S.: Dynamics of muscular contraction. *Proc. Soc. ser B*, 96, 398, 1924.
- Hill, A.V.: The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. Roc. ser B*, 126, 136, 1938.
- Jacobson, A.L.: Effect of ouabain on the ATPase of cardiac myosin B at high ionic strength. *Cir. Res.*, 22, 625, 1968.
- Katz, A.M.: Influence of tropomyosin upon the reactions of actomyosin at low ionic strength. *J. Biol. Chem.*, 239, 3304, 1964.
- Katz, A.M.: Absence of effect of cardiac glycosides on cardiac myosin: and a Ca^{++} -sensitive reconstituted cardiac actomyosin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154, 558, 1966.
- Katz, A.M., Repke, D.L., Upshaw, J.E., Polascik, M.A.: Characterization of dog cardiac microsomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 205, 473, 1970.
- Lee, K.S., Hong, S.A., Kang, D.H.: Effect of the cardiac glycosides on interaction of Ca^{++} with mitochondria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172, 180, 1969.
- Lee, K.S., Shin, M.R., Kang, D.H., Chen, K.K.: Studies on the mechanism of cardiac glycoside action. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 1055, 1970.
- Lee, K.S., W. Klaus.: The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol. Rev.*, 23, 193, 1971.
- Luchi, R.J., E.M. Kritcher.: Drug effects on cardiac myosin ATPase activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 158, 540, 1967.
- Masui, H., Schwartz, A.: Purification and properties of highly active ouabain sensitive Na^+K^+ -dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Acta.*, 128, 380, 1966.
- Stowring, L., W.J. Bowen, P. Mattingly, M. Morales.: Stimulation of myosin B superprecipitation by ouabain and digoxin. *Cir. Res.*, 19, 496, 1966.
- Szent-Gyorgi, A.: Chemistry of muscular contraction. New York Academ. Press, 1947.
- Taussky, H.H., Shorr, E.: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202, 675, 1953.
- Yasui, T., S. Watanabe.: A study of superprecipitation of myosin B by the change in turbidity. *J. Biol. Chem.*, 240, 98, 1965.