

心臟筋 mitochondria 의 Ca^{++} 유리에 대한 Na^+ 의 影響*

서울대학교 의과대학 약리학교실

金 龍 植·朴 贊 雄·金 明 石

= Abstract =

The Influence of Sodium on the Calcium Release from Cardiac Mitochondria

Yong Sik Kim, Chan Woong Park and Myung Suk Kim

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

The Na^+ -induced calcium release and the effect of sodium on the transmitochondrial calcium flux were observed in mitochondria isolated from pig ventricular myocardium by Milipore filtration technique using radioisotope ^{45}Ca .

The release of calcium from cardiac mitochondria was induced by small amount of sodium, and was promoted by increasing sodium concentration in the incubation medium. The extent of the Na^+ -induced calcium release was much greater in the absence of extramitochondrial calcium than in the presence of calcium.

At steady state of calcium binding on the mitochondrial membrane unidirectional calcium influx was inhibited by sodium and unidirectional calcium efflux was increased.

From the above results, it was suggested that calcium might be released from cardiac mitochondria in exchange with sodium through the mediation of the postulated " Na^+/Ca^{++} exchange" mechanism.

緒 論

근수축기전에 중요한 역할을 한다고 알려진 Ca^{++} 은 수축시 세포내에 농도가 $10^{-8}M$ 에서 $10^{-5}M$ 정도로 상승되며, 이 Ca^{++} 이 troponin 과 결합하여 troponin-tropomyosin system 에 의한 actin-myosin 의 상호연결 억제작용을 제거하므로써 actomyosin ATPase 를 활성화시켜 ATP 를 분해하며, 이 energy 를 사용하여 근수축이 일어나고, 증가된 세포내 유리 Ca^{++} 은 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 등을 포함한 여러 장소를 통해 다양한 기전으로 다시 정상 상태로 조절된다고 알려져 있다(Dhalla, Sulakhe et

* 본 연구는 1981년도 서울대학교병원 연구비의 일부 보조에 의하여 이루어졌음.

al, 1974; Langer, 1968, 1973; Fozzard, 1977).

그러나 이러한 수축시의 Ca^{++} 상승이 어떠한 기전으로 어디에서 유래되는지는 명확히 알려진 바 없으며 골격근의 경우 sarcoplasmic reticulum 이 현재로서는 중요한 의미를 갖고 있다고 하나(Ebashi and Endo, 1968; Ebashi, 1976; Endo, 1977), 심근에서는 골격근과는 달리 sarcoplasmic reticulum 의 양이 극히 적을 뿐 아니라, 조직적으로 배열되어 있지도 않고(Ebashi and Endo, 1968; Fuchs, 1974) Ca^{++} 운반 능력이 낮으며 또한 심근에서는 세포외액의 Ca^{++} 농도에 따라 수축력이 크게 영향을 받는 등의 현상으로 보아 더욱 복잡한 기전으로 Ca^{++} 농도가 조절되리라 알려져 있다.

한편 심근에 풍부한 mitochondria 는 호흡의존성과 ATP 의존성인 기전으로 Ca^{++} 을 흡수하며, 그 운반능력이 심장근의 수축, 이완을 조절하고도 남을 만큼 충

는하다고 보고된 바 있으나(Chance, 1965, Lehninger et al, 1969, 1970; Carafoli, 1974, 1975; Affolter et al, 1976; Dhalla et al, 1977) 이러한 mitochondria가 excitation-contraction coupling(E-C coupling)에 관여하리라는 데에는 일반적으로 의심을 받고 있으며 이는 mitochondria가 transverse tubule 또는 세포막과 연속성이 없는데 기인하고 있다. 그러나 전기적 흥분에 의해서라기 보다는 이로 인한 화학적 자극을 통하여 Ca^{++} 이 유리될 수 있다면 E-C coupling에서 mitochondria의 역할도 배제할 수 없을 것이다.

실제로 mitochondria의 여러 호흡억제제 또는 세포내 구성이온 등을 사용한 mitochondria의 Ca^{++} 조절기전에 관한 연구가 계속되고 있으며(Crompton et al, 1976, 1977; Harris, 1979) 특히 Na^+ 에 의하여 특히적으로 Ca^{++} 유리가 일어난다는 Carafoli(1974), Crompton et al(1976, 1977), 金(1978)등의 보고는 digitalis 강심배당체의 강심기전을 설명하는데 있어서 Na^+ - K^+ -ATPase의 억제와 심근세포내 유리 Ca^{++} 농도 증가와의 연관성을 시사해 주는 현상으로 보여져 흥미를 끌고 있다.

본 연구에서는 이와같은 mitochondria로부터의 Ca^{++} 유리기전의 일단을 알아보기 위하여 mitochondria의 Ca^{++} 흡수반응이 steady state에 이르렀을때 unidirectional Ca^{++} flux에 대한 Na^+ 의 영향을 검토하였다.

實驗 方法

1) Mitochondria 추출

실험 동물로는 돼지를 사용 하였으며 Sulakhe and Dhalla(1971)의 방법에 준하여 심실에서 추출하였다. 심내외막을 제거하고 심근만을 취하여 미리 냉각시킨 추출용액(0.25 M Sucrose, 5 mM Tris HCl pH 7.0, 1 mM EDTA)이 든 용기에 넣고 잘게 썰어 이 조직을 상기의 추출용액 9 volume 과 섞어 Teflon homogenizer를 사용하여 homogenize 하였다. Homogenization 후 1,000 xg 에서 20분동안 냉동원심분리하여 심근섬유조절편, 핵, 결체조직등을 제거하고 상등액만을 취하여 비결의 cheese cloth를 통하여 여과하고, 이 여액을 10,000 xg 에서 20분동안 냉동원심분리하였고, 얻어진 mitochondria 잔사를 9 volume의 동일추출용액에 부유하여 같은 방법으로 세척하였다. 그후 EDTA를 제외한 0.25 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl pH 7.0용액으로 다시 한번 세척하였다. 위와같은 방법으로 얻어

진 mitochondria를 단백질농도가 6~8 mg/ml되게 0.25 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl pH 6.8용액에 부유하여 실험에 사용하였다.

모든 추출조작은 4°C 이하에서 시행하였으며 단백질농도는 Folin-Phenol시약을 사용하여 Lowry(1951)방법으로 측정하였다.

2) Mitochondria의 Ca^{++} 흡수와 유리

Mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리는 방사성 ^{45}Ca 를 사용하여 Lee and Choi(1966)에 준한 Milipore filter 방법으로 측정하였다.

진탕수욕조(25°C)에서 100 mM KCl, 10 mM Tris-Succinate, 20 mM Tris-HCl pH 6.8, $Ca^{++}+^{45}Ca$ 10~30 μM 이 들어 있는 반응액 3 ml에 mitochondria를 1 mg/ml되게 첨가하여 흡수반응을 시작하였다.

Ca^{++} 흡수가 최대로 일정수준에 도달한 반응액에 1~5 mM Na^+ 을 또는 1 mM EGTA와 함께 1~5 mM Na^+ 을 첨가하여 유리반응을 시작하였다. 유리반응 시작후 3분동안 30초마다 반응액 0.2 ml씩 취하여 Milipore filter(HAWP 13 mm, pore size 0.45 μ)에 옮겨 즉시 여과하였다. 이 여액 0.1 ml를 10 ml의 liquid scintillation cocktail(Bray's solution)이 들어있는 vial에 첨가한 후, liquid scintillation spectrometer(Nuclear Enterprises, Scotland)로 방사능을 측정하여 유리된 Ca^{++} 량의 계산에 이용하였다.

한편 steady state에서의 unidirectional Ca^{++} influx는 같은 조건의 반응액에서 cold Ca^{++} 으로만 흡수반응을 시작시키고 Ca^{++} 흡수가 일정수준에 도달한 후 반응액 내 cold Ca^{++} 양에 영향을 주지 않도록 high specific activity의 ^{45}Ca 를 미량(0.4 $\mu Ci/ml$) 첨가하여 잔여 Ca^{++} 이 흡수되는 양을 측정하여 얻었고 Na^+ 에 의한 효과 관찰시 Na^+ 을 방사성 ^{45}Ca 와 동시에 투여하였다.

또한 unidirectional Ca^{++} efflux는 각 시간에서의 unidirectional Ca influx에 Na^+ 에 의하여 유리되는 net Ca^{++} 량을 더해서 구하였다.

實驗 結果

1) Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리

반응액내 Ca^{++} 존재 하에서 mitochondria의 Ca^{++} 흡수반응은 5~6분 사이에 일정수준의 최대치에 도달하였고, 8분까지 계속 plateau를 유지함을 볼 수 있었으며 이때 결합된 Ca^{++} 량은 반응액내 Ca^{++} 이 10 μM 일

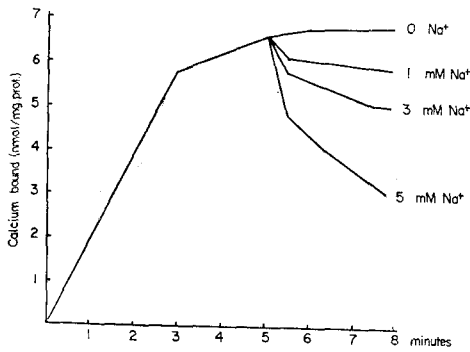


Fig. 1. Sodium-induced calcium release from pig heart mitochondria incubated in a medium with $10\mu\text{M}[\text{Ca}^{++}]$.

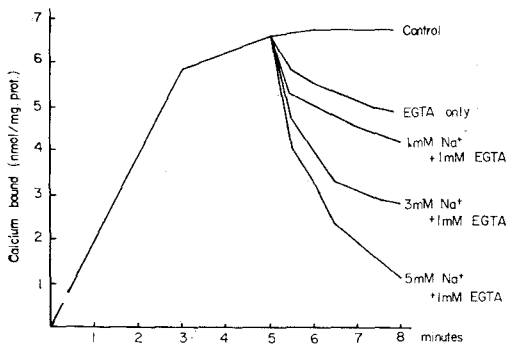


Fig. 2. The release of Calcium from heart mitochondria by sodium in the presence of 1mM EGTA.

Table 1. Net Na^{+} -induced Ca^{++} release rate (Mean \pm S.D.)

Ca^{++} bound (nmol/mg. prot)	Net Na^{+} -induced Ca^{++} release rate (nmol Ca^{++} /mg. prot. /min)	
	6.69 \pm 0.45	23.63 \pm 2.51
Na^{+} , mM		
1	0.1 \pm 0.02	1.2 \pm 0.35
3	0.36 \pm 0.06	1.8 \pm 0.45
5	0.81 \pm 0.23	2.14 \pm 0.53

때 6.69 \pm 0.45, 30 μM 일때 23.63 \pm 2.51 nmol/mg. prot. 이었으며 반응액내 잔존하는 Ca^{++} 농도는 각각 3.31 \pm 0.45, 6.37 \pm 2.51 μM 이었다.

Ca^{++} 흡수가 일정수준에 도달한 다음 Na^{+} 을 투여하였을때 결합된 Ca^{++} 이 급격히 유리되었으며, 반응액에 10 μM Ca^{++} 을 첨가한 경우 유리반응 1분에 유리되는 Ca^{++} 량은 Na^{+} 농도를 1, 3, 5 mM 로 증가시켜감에 따라

Table 2. Na^{+} -induced Ca^{++} release rate in the presence of 1mM EGTA (Mean \pm S.D.)

Na^{+} , mM	bound Ca^{++} (nmol/mg. prot)	Na^{+} -induced Ca^{++} release rate (nmol Ca^{++} /mg. prot./min.)
	6.69 \pm 0.45	23.63 \pm 2.51
0	0.50 \pm 0.09	2.36 \pm 0.52
1	0.58 \pm 0.04	2.64 \pm 0.80
3	0.80 \pm 0.25	3.31 \pm 0.91
5	1.43 \pm 0.31	5.05 \pm 1.25

0.51 \pm 0.23, 0.85 \pm 0.48, 1.91 \pm 0.64 nmol/mg. prot. 으로 점차 증가하였다(Fig. 1).

이때 처음 30초 동안에 유리되는 Ca^{++} 에는 glassware 등의 비선택적인 Ca^{++} 과의 교환도 포함되리라 믿어져 그 다음 시간부터 유리되는 Ca^{++} 량으로 부터 Net Na^{+} induced Ca^{++} release rate 를 구하였으며, 이들의 유리는 표 1과 같이 Na^{+} 농도에 따라 증가 하였다 (Table 1).

한편 일단 유리된 Ca^{++} 에 대해서는 재흡수가 일어나지 않도록 유리반응액에 Ca^{++} chelator 인 EGTA 를 1 mM 첨가하고 Na^{+} 에 의하여 유리되는 Ca^{++} 량을 측정 한 결과, 10 μM Ca^{++} 이 첨가된 반응 조건에서 유리반응 1분 후 유리되는 Ca^{++} 량이 Na^{+} 농도가 0, 1, 3, 5 mM 일때 각각 1.31 \pm 0.69, 1.78 \pm 0.74, 3.21 \pm 1.06, 3.70 \pm 0.74 nmol/mg. prot 으로 Na^{+} 농도 증가에 따라 증가되었다(Fig. 2).

같은 방법으로 EGTA 1 mM 존재시 Na^{+} -induced Ca^{++} release rate 를 구하였고, 이러한 Ca^{++} 유리율이 역시 Na^{+} 농도 증가에 따라 커짐을 보였다(Table 2).

한편 EGTA 첨가시의 Ca^{++} 유리율과 단지 Na^{+} 만 투여하여 얻은 Ca^{++} 유리율을 비교한 결과 EGTA 첨가시의 Ca^{++} 유리율이 현저히 증가함을 보였다(Fig. 3).

2) Unidirectional Ca^{++} influx 와 Ca^{++} efflux

심근 mitochondria 의 Ca^{++} 운반은 흡수반응과 유리 반응의 서로 다른 2개의 과정으로 수행된다고 보고된 바(Crompton et al, 1976; Carafoli and Crompton, 1978) Na^{+} 에 의한 Ca^{++} 유리는 Ca^{++} influx 에 영향을 미치거나, 또는 Ca^{++} efflux 에 영향을 미쳐서 일어날 수 있는 현상이므로 steady state에서의 unidirectional Ca^{++} influx 가 Na^{+} 에 의해 어떻게 변화되는가를 검토한 결과 잔여 Ca^{++} 이 3.31 μM 인 경우 3분 동안에 흡수되는 총 Ca^{++} 량은 대조치 3.28 \pm 0.53 nmol/mg.

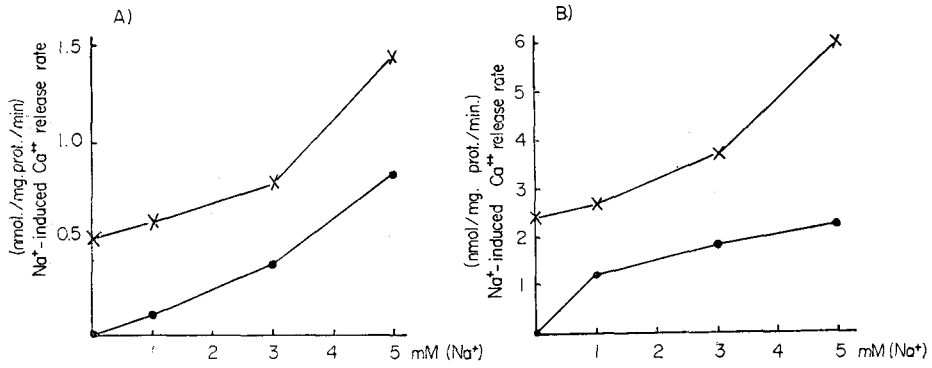


Fig. 3. The Na^+ -induced Ca^{++} release rate in the presence (●) and absence (×) of extramitochondrial $[Ca^{++}]$.
 A: Mitochondrial bound $[Ca^{++}]$: 6.69 nmol/mg. prot.
 B: Mitochondrial bound $[Ca^{++}]$: 23.67 nmol/mg. prot.

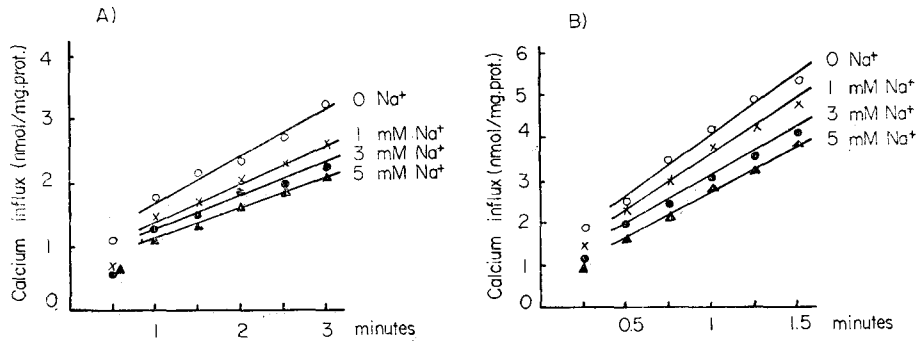


Fig. 4. Unidirectional calcium influx at steady state of uptake reaction. Total calcium concentration in the incubation medium: A) $10 \mu M$, B) $30 \mu M$.

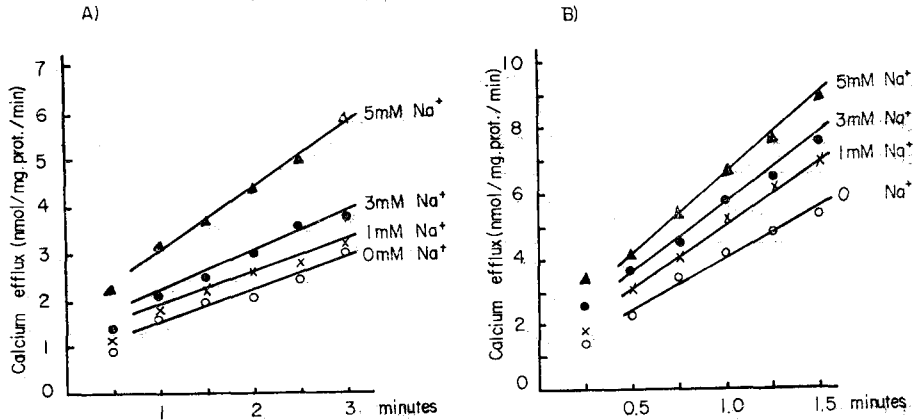


Fig. 5. Unidirectional calcium efflux at steady state of uptake reaction. Total calcium concentration in the incubation medium: A) $10 \mu M$ B) $30 \mu M$

prot 에서 Na^+ 1, 3, 5 mM 을 투여하였을 때 각각 2.59 ± 0.32 , 2.43 ± 0.29 , 2.04 ± 0.36 nmol/mg. prot 으로 Na^+ 농도의 증가에 따라 unidirectional Ca^{++} influx 가 점차 억제되었고 (Fig. 4), unidirectional Ca^{++}

efflux 는 대조치 3.10 ± 0.53 nmol/mg. prot 에서 Na^+ 농도가 1, 3, 5 mM 일 때 3.15 ± 0.32 , 3.84 ± 0.29 , 5.93 ± 0.36 nmol/mg. prot 으로 증가 함을 보여 (Fig. 5) Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리는 unidirectional Ca^{++} influx

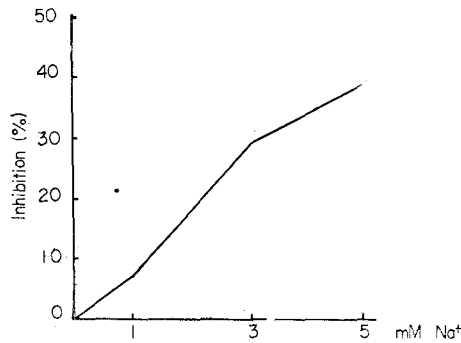


Fig. 6. The inhibition of unidirectional Ca⁺⁺ influx by Na⁺.

Table 3. Unidirectional Ca⁺⁺ influx rate and efflux rate

(Mean±S.D.)

Na ⁺ , mM	bound Ca ⁺⁺ (nmol/mg. prot.)	Unidirectional Ca ⁺⁺ influx rate (nmol Ca ⁺⁺ /mg. prot/min)		Unidirectional Ca ⁺⁺ efflux rate (nmol Ca ⁺⁺ /mg. prot/min)	
		6.69±0.45	23.63±2.51	6.69±0.45	23.63
0		0.737±0.34	2.9 ±0.87	0.731±0.35	2.95±0.78
1		0.687±0.14	2.6 ±0.84	0.787±0.15	3.6 ±0.68
3		0.51 ±0.15	2.25±0.59	0.92 ±0.23	4.05±0.59
5		0.47 ±0.19	2.05±0.79	1.28 ±0.22	4.7 ±0.91

와 efflux 모두에 영향을 미쳐 일어남을 볼 수 있었다. 또한 이들로 부터 steady state에서의 unidirectional Ca⁺⁺ influx rate와 efflux rate를 얻었으며, Na⁺농도의 증가로 unidirectional Ca⁺⁺ influx rate는 점차 감소되고, efflux rate는 증가됨을 보였다(Table 3 and Fig. 6).

考 察

Mitochondria의 세포내 Ca⁺⁺농도 조절에의 관여 여부는 논란이 많으나, 세포내에 존재하는 이온, 어떤 특정한 호흡억제제들과 또는 mitochondria의 oxidative phosphorylation uncoupler들에 의한 Ca⁺⁺흡수와 유리에 대한 연구 보고들에 의하여 점차 그 기전이 밝혀지고 있다(Crompton et al 1976, 1977; Harris, 1979; Carafoli, 1974).

이러한 Ca⁺⁺운반능력은 시험관내에서는 호흡연쇄에 의해서 또는 ATP 분해에 의한 energy에 의해서 수행될 수 있다고 알려졌으며(Carafoli: 1974: 1975.: Crompton et al, 1976), 체내에서는 이를 모두가 관여할 수 있다고 보고 있으나 이들의 관여정도는 아직 알려

져 있지 않다.

한편 현재까지 E-C Coupling에 주된 작용을 한다고 믿어지는 sarcoplasmic reticulum에서도 energy의존성인 Ca⁺⁺운반능력이 있음은 주지의 사실이나(Ebashi and Endo, 1968: Ebashi, 1976: Endo, 1977) mitochondria의 Ca⁺⁺운반과는 많은 차이가 있음을 볼 수 있다. 예를 들면 sarcoplasmic reticulum에서는 mitochondria와는 달리 Ca⁺⁺-stimulated, Mg⁺⁺-dependent ATPase를 쉽게 증명할 수 있고, mitochondria에서는 Ca⁺⁺흡수가 oligomycin, azide, dicumarol, dinitrophenol 등으로 쉽게 억제될 수 있으나, sarcoplasmic reticulum의 Ca⁺⁺흡수에는 별 영향을 미치지 못하는 점과, 5'-AMP, 3'-AMP 등에 의하여 sarcoplasmic reticulum과는 다르게 mitochondria의 Ca⁺⁺흡수가 감소된다는 것들이다(Dhalla, McNamara et al, 1970).

Mitochondria의 Ca⁺⁺흡수 정도와 흡수율이 sarcoplasmic reticulum보다는 작으나, Carafoli(1975)는 심근에서의 mitochondria의 양, Ca⁺⁺과의 친화성, Ca⁺⁺의 저장능력 및 결합속도로 보아 심장근의 수축, 이완을 조절하고도 남을 만큼 충분한 Ca⁺⁺운반능력이 있다고 보고하였으나(Chance, 1965; Lehninger et al:

1969, 1970; Carafoli, 1974, 1975; Affolter et al, 1976; Dhalla et al, 1977), 아직까지는 mitochondria의 E-C coupling에의 관여여부는 의심을 받고 있는데 이는 mitochondria가 transverse tubule 또는 세포막과 연속성이 없어 세포막 활동전압이 직접 mitochondria에 전달될 가능성이 희박하다는 점 때문이다. 그러나 mitochondria의 Ca^{++} 유리가 전기적 흥분현상이라기 보다는 어떤 화학적 매개체에 의하여 간접적으로 일어난다면 mitochondria의 E-C coupling에의 관여를 배제할 수는 없는 것이며, 실제로 H^+ 배출에 동반되어 Ca^{++} 흡수가 일어나듯 mitochondria로 부터 Ca^{++} 유리가 반응액의 H^+ 흡수와 동반되어 일어남을 볼 수 있고(Lehninger et al, 1969), Haugaard 등(1969)은 ATP, Pi, Mg^{++} 의 상대적 농도가 mitochondria의 Ca^{++} 운반의 방향에 중요한 효과를 나타낸다고 보고하였다. 특히 Na^+ 에 의하여 심근 mitochondria로 부터 Ca^{++} 유리가 일어남을 볼 수 있어(Carafoli et al, 1974; Carafoli, 1974; Crompton, Cepano et al, 1976; 金, 1978) 이러한 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리가 정상조건에서 일어날 수 있는지는 의문이나, 심장 및 다른 여러 기관의 세포막에서 Na^+ 과 Ca^{++} 의 교환기전이 있는 것으로 보아 정상생리적 기전이라고 설명할 수 있으며, 한편으로 보면 세포막 탈분극시 발생하는 급속한 Na^+ 내향전류로 Na^+ 이 세포내부로 유입된다는 사실로 보아도 Na^+ 이 그 매개체가 될 수 있으리라고 추정할 수 있다.

본 실험에서 Ca^{++} 유리가 Na^+ 농도의 증가에 따라 점차 증가됨은 앞서의 여러 비교와 부합되었으나, 일반적으로 mitochondria의 Ca^{++} 흡수, 유리현상을 관찰하는데 사용 되는 Ca^{++} -selective microelectrode 또는 Ca^{++} 흡수의 선택적인 억제제인 Ruthenium Red를 처리하여 비교된(Crompton et al, 1976, 1977; Carafoli, 1975, 1978) Ca^{++} 유리율보다는 낮은 값을 보였다.

한편 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리율은 EGTA를 같이 첨가한 경우보다 Na^+ 만을 투여한 경우에 낮은 결과를 보였는데 이는 Na^+ 만이 있을 경우에는 반응액내의 잔여 Ca^{++} 과 mitochondria에 결합된 Ca^{++} 사이의 Ca^{++} - Ca^{++} 교환기전에 의하여 유리되었던 Ca^{++} 이 다시 재흡수되므로, EGTA를 같이 투여하여 잔여 Ca^{++} 농도를 거의 0으로 함으로서 일단 유리된 Ca^{++} 이 재흡수되지 못하게 하였을 때보다 낮은 결과를 보인 것으로 믿어지지만, 일면으로는 반응액내의 잔여 Ca^{++} 이 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리기전에 대하여 직접적인 또는 상경적인 억제를 하기 때문이라고도 생각할 수 있으며, 또한

unidirectional Ca^{++} influx가 Na^+ 에 의하여 감소되는 결과로 보아 steady state에서의 반응액내 잔여 Ca^{++} 과 mitochondria에 결합된 Ca^{++} 사이의 Ca^{++} - Ca^{++} 교환에 Na^+ 이 직접 영향을 미쳐 Ca^{++} - Ca^{++} 교환을 억제한다고 할 수 있었다.

이상의 실험 결과를 종합하여 보면 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리 과정은 Na^+ 이 Ca^{++} - Ca^{++} 교환을 억제하여 steady state에서의 Ca^{++} influx를 감소시키며, 또한 반응액내에 존재하는 Ca^{++} 량의 다소에 의해서도 영향을 받게 되므로, mitochondria에서의 Ca^{++} 운반에도 sarcolemma에 존재한다고 알려진 Na^+ - Ca^{++} 교환기전(Reuter, 1974)이 관여되리라 사료된다.

한편 Crompton 등(1976)은 소량의 Ruthenium Red가 mitochondria의 energy transduction에는 영향이 없이 mitochondria의 Ca^{++} 흡수를 억제하나 Ca^{++} 유리에는 영향을 주지 않는다고 하였고, 이때 Na^+ 첨가로 Ca^{++} 유리가 일어남으로 보아 Ca^{++} 흡수는 Ruthenium Red-sensitive system을 통하여, Ca^{++} 유리는 Na^+ -sensitive 한 다른 통로를 통하여 일어난다고 하였다. 그러나 최근 Crompton 등(1977)은 mitochondria의 Ca^{++} 운반의 또 다른 기전으로 Ruthenium Red-insensitive 하고, La^{+++} -sensitive 한 교환-확산운반체(Exchange-Diffusion Carrier)의 존재를 주장하고 있으며, 이 운반체를 통한 mitochondria내 Ca^{++} 과 반응액 Ca^{++} 사이의 교환은 Na^+ 에 의하여 상경적으로 억제되며, 또한 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리시 이에 동반되어 Na^+ 이 mitochondria내로 유입된다고 보고하였다.

이러한 Na^+ - Ca^{++} 교환 기전의 존재를 확실히 증명하기 위해서는 Ca^{++} 유리에 동반된 mitochondria내 Na^+ 농도의 증가여부를, 그리고 이렇게 mitochondria내로 유입된 Na^+ 이 mitochondria내 Na^+ 과도 상경적 작용을 보일 것인지를 규명하여야만 될 것이다.

Digitalis 강심배당체의 강심효과는 E-C coupling이 촉진되어 나타나는 결과일 것으로 인정되고 있으나, 현재까지는 불명확한 점이 많으며, 지금까지 연구보고된 결과로는 E-C coupling에 관계되는 각각의 요소들에 별다른 영향을 미치지 않고, 심근세포내 exchangeable free Ca^{++} 농도만을 증가시킨다는 결론이어서, digitalis 강심배당체의 강심기전을 규명하는데 있어서 이러한 Ca^{++} 이 증가되는 기전을 밝히는 것이 가장 중요한 점의 하나로 여겨지고 있다(Løe and Klaus, 1971; Schwartz, 1969).

한편 강심효과를 보이는 여러 약물에서도 Na^+ - K^+ -ATPase의 억제가 반드시 나타나지는 않으며, sarcol-

emma $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 외에도 다른 장소에 대한 digitalis의 작용여부 등의 논란이 되고 있으나, digitalis 강심배당체에 의해서 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 가 특이하게 억제된다는 점이 유일한 생화학적 현상으로서 강심기전과 직접 또는 간접적으로 관련되리라 추정되고 있다. 이는 전기적 흥분으로 활동전압 발생시 급속한 Na^+ 내향전류를 따라 들어온 Na^+ 이 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 에 의하여 밖으로 방출되는 과정의 억제로 세포내 Na^+ 농도가 증가되고, 이러한 Na^+ 농도의 증가가 명확하지는 않으나, 여러 장소에서 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ 교환기전으로 심근세포내 Ca^{++} 증가를 일으키리라 가정하고 있다.

그러나 digitalis 강심배당체에 의해서 실제로 세포내 Na^+ 의 증가가 일어나는가 하는 결과, 또 증가된 Na^+ 이 심근수축을 증가시키기에 충분한 정도로 세포내 Ca^{++} 농도를 높일 수 있는 것인지의 규명이 필요하나, 지금까지의 보고로는 만족할만한 결과는 없는 상태이며, 최근 $\text{Na}^+\text{-sensitive microelectrode}$ 를 사용하여 digitalis 투여로 세포내 Na^+ 이 증가한다는 보고가 다소 있는 정도이다(Lee and Fozzard, 1975; Akera and Brody, 1978).

본 실험결과와 이상의 보고에서 보듯 Ca^{++} 과 Na^+ 의 운반매개체에 의한 교환은 여러 조직의 세포막에서 잘 설명되고 있는 현상으로서, digitalis의 강심기전 연구에서도 sarcolemma에서의 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ 교환기전에 의하여 세포외액으로부터 심근세포내로 Ca^{++} 유입을 증가시킬 것이라는 보고가 많이 있으나 그 외에도 이러한 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ 교환이 mitochondria에도 존재하여, digitalis에 의한 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 억제후 세포내에 증가되는 Na^+ 이 mitochondria로 부터 Ca^{++} 을 유리시켜 E-C coupling을 촉진시켜 강심 효과를 보이리라 생각된다.

要 約

Mitochondria로 부터의 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리현상은 digitalis의 강심기전을 설명하는데 있어 세포내 Ca^{++} 농도 증가기전을 설명할 수 있는 현상의 하나로 보여지므로 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리와 이러한 Ca^{++} 유리가 반응액내 Ca^{++} 존재 유무로 어떠한 변화를 받는지를 비교 검토하였고 steady state에서의 Ca^{++} flux에 대한 Na^+ 의 효과를 관찰하였다.

Na^+ 의 증가에 따라 mitochondria에 흡수된 Ca^{++} 의 유리량과 유리율이 증가하였고, EGTA 1 mM 투여로 반응액내 잔여 Ca^{++} 을 없을 경우 Ca^{++} 유리가 증가함을 보여, 반응액내 잔여 Ca^{++} 이 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리

를 억제하리라 믿어진다.

한편 steady state에서의 unidirectional Ca^{++} influx가 Na^+ 에 의하여 감소되는 점으로 미루어, Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리는 Na^+ 이 $\text{Ca}^{++}\text{-Ca}^{++}$ 교환을 직접 억제하여 Ca^{++} influx를 감소시켜 나타나는 결과로 생각된다.

Na^+ 에 의한 unidirectional Ca^{++} influx의 억제는 $\text{Ca}^{++}\text{-Ca}^{++}$ 교환에 Na^+ 이 직접 작용하며, 또한 반응액내 Ca^{++} 의 다소에 따라 Na^+ 에 의한 Ca^{++} 유리정도가 변화되는 양상으로 미루어 보아 mitochondria의 Ca^{++} 운반의 일부는 Na^+ 과 Ca^{++} 이 상경적으로 작용하는 종류의 동일매개체에 의하여 이루어질 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

金明石: Na^+ 및 K^+ 에 의한 심장근 Mitochondria에서의 Ca^{++} 유리작용. 대한약리학잡지, 14:1-11, 1978.

Akera, T., Larsen, F.S., Brody, T.M.: The effect of ouabain on Sodium and Potassium-activated adenosin triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J. Pharmacol. Exp. Ther. 170:17-25, 1969.

Affolter, H., Chiesi, M., Dabrowska, R., Carafoli, E.: Calcium regulation in heart cells. The interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum with troponin bound calcium. Eur. J. Biochem. 67:389-396, 1976.

Carafoli, E.: Mitochondrial uptake of calcium ion and the regulation of cell function. Biochem. Soc. Symp. 39:89-109, 1974.

Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovelti, R., and Kratzing, C.: The release of calcium from heart mitochondria by sodium. J. Mol. Cell. Cardiol. 6:361-371, 1974.

Carafoli, E.: Mitochondria, Ca^{++} transport and the regulation of heart contraction and metabolism. J. Mol. Cell. Cardiol. 7:83-89, 1975.

Carafoli, E. and Crompton, M.: The regulation of intracellular calcium by mitochondria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 307:269-284, 1978.

Chance, B.: The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem. 240:2729-

- 2748, 1965.
- Crompton, M., Siegel, E., Salzmann, M., and Carafoli, E.: *A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{++} into heart mitochondria.* *Eur. J. Biochem.* 69:420-434, 1976.
- Crompton, M., Cepano, M., and Carafoli, E.: *The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism of the regulation of Mitochondrial calcium.* *Eur. J. Biochem.* 69:453-462, 1976.
- Crompton, M., Kunzi, M., and Carafoli, E.: *Calcium-induced and Sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a Sodium-Calcium carrier.* *Eur. J. Biochem.* 79:549-558, 1979.
- Dhalla, N.S., McNamara, D.B., and Sulakhe, P. V.: *Excitation-Contraction coupling in heart. V. Contribution of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the regulation of calcium accumulation in the heart.* *Cardiology.* 55:178-191, 1970.
- Dhalla, N.S., Sulakhe, P.V., Fedelesova, M., and Yates, J.C.: *Molecular abnormalities in the cardiomyopathy.* *Advances in cardiology.* Vol 13. Karger, Basel. pp. 282-300, 1974.
- Dhalla, N.S., Zieglhoffer, A., and Harrow, A.C.: *Regulatory role of cell, membrane systems in heart function.* *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55:1211-1234, 1977.
- Ebashi, S., and Endo, M.: *Calcium and muscle contraction.* *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18:123-183, 1968.
- Endo, M.: *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.* *Physiol. Rev.* 57:71-108, 1977.
- Fozzard, H.A.: *Heart:Excitation-Contraction Coupling.* *Ann. Rev. Physiol.* 39:201-220, 1977.
- Fuchs, F.: *Striated muscle.* *Ann. Rev. Physiol.* 36:461-502, 1974.
- Harris, E.J.: *Modulation of Ca^{++} efflux from heart mitochondria.* *Biochem. J.* 178:673-680, 1979.
- Haugaard, N., Haugaard, E.S., Lee, N.H., and Horn, R.S.: *Possible role of mitochondria in regulation of cardiac contractility.* *Fed. Proc.* *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28:1657-1662, 1969.
- Langer, C.A.: *Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility.* *Physiol. Rev.* 48:708-757, 1968.
- Langer, G.A.: *Excitation-Contraction coupling.* *Ann. Rev. Physiol.* 35:55-86, 1973.
- Lee, K.S., Choi, S.J.: *Effect of the cardiac glycoside on the Ca^{++} uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153:114-120, 1966.
- Lee, C.O., Fozzard, H.A.: *Activities of potassium and Sodium ions in rabbit heart muscle.* *J. Gen. Physiol.* 65:695-708, 1975.
- Lee, K.S., Klaus, W.: *The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.* *Pharmacol. Rev.* 23:193-261, 1971.
- Lehninger, A.L., Carafoli, E., Rossi, C.S.: *Energy-linked ion movements in mitochondrial system.* *Adv. Enzymol.* 29:259-320, 1969.
- Lehninger, A.L.: *Mitochondria and Calcium ion transport.* *Biochem. J.* 119-138, 1970.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S.: *Protein measurement with the folin-phenol reagent.* *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- Reuter, H.: *Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance.* *Circ. Rec.* 34:599-605, 1974.
- Schuster, S.M., and Olson, M.: *Studies on the energy dependent uptake of divalent metal ions by beef heart mitochondria.* *J. Biol. Chem.* 249:7151-7158, 1974.
- Schwartz, A., Allen, J.C., Hargaya, S.: *Possible involvement of cardiac Na^+-K^+ -ATPase in the mechanism of action of cardiac glycosides.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 163:31-41, 1969.
- Sulakhe, P.V., Dhalla, N.S.: *E-C coupling in heart. VII. Calcium accumulation:subcellular particles in congestive heart failure.* *J. Clin. Invest.* 60:1019-1027, 1971.