

Higenamine 이 심근 Sarcoplasmic Reticulum 의 칼슘운반에 미치는 영향에 관한 연구

서울의대 흉부의과학교실 및 약리학교실*

김 주 현 · 이 영 균 · 김 혜 원*
김 명 석* · 박 찬 응* · 임 정 규*

= Abstract =

The Effect of Higenamine on the Calcium Transport of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum

Joo Hyun Kim, Yung Kyoon Lee, Hae Won Kim*, Myung Suk Kim*,
Chan Woong Park*, and Jung Kyo Lim*

Dept. of Thoracic Surgery and *Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Higenamine (dl-demethylcoclaurine, dl-1-(4-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride), which has recently been isolated from Aconite root by Drs. Kosuge and Yokota, has known to be the main cardiotonic component of the Aconite root.

The present study was undertaken to investigate the effects of Higenamine on the calcium binding and release and ATPase activity of fragmented cardiac sarcoplasmic reticulum under in vitro condition. The calcium binding and release of sarcoplasmic reticulum were measured by using the double-beam spectrophotometer and the calcium sensitive dye, murexide.

In the presence of 10^{-4} ~ 5×10^{-3} M of Higenamine, the maximal calcium binding and the initial binding rate of porcine cardiac sarcoplasmic reticulum were inhibited dose dependently by up to 43%. However, the calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum, which was loaded with Ca^{++} (50 μM), was stimulated in dose dependent manner.

When incubated in the medium of 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 0.05 mM CaCl_2 and 0.014~1 mM Tris-ATP at 30°C in the presence of Higenamine (10^{-4} ~ 5×10^{-3} M), both Ca^{++} - and Mg^{++} -ATPase of sarcoplasmic reticulum were inhibited non-competitively by Higenamine and values of K_i were 4.896 mM and 6.875 mM respectively.

It is suggested from the above findings that the cardiotonic effects of Higenamine might be partially explained by the inhibition of calcium binding and the stimulation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum which may increase the free intracellular calcium that is available in the contraction of the cardiac muscle fiber.

서 론

심장근의 수축력을 증가시키는 강심효과를 갖는 약물

본 연구는 1982년도 서울대학교병원 특진연구비 보조로 이루어진 것임.

로서 현재 임상에서 심부전증등의 치료약으로 사용되고 있는 것으로는 디지탈리스배당체 제통이 유일한 약물이다. 그러나 디지탈리스강심배당체는 그 안전역이 매우 좁아서 치료용량 범위내에서도 독작용의 출현이 빈번하기 때문에 보다 안전역이 넓고 독성이 낮은 강심약물의 개발은 많은 임상가와 약리학자들의 관심의 대상이

되어왔다.

1958년 矢數는 Ranunculaceae과에 속하는 다년생 초본인 부자의 알코올추출물중 클로로포름으로 알카로이드 성분을 제거한 수용성분획이 개구리 척추심장에서 강심작용을 나타낸다고 보고한 바가 있었으며, 그 이후 김등(1973)은 그 강심작용을 보이는 부자의 알코올추출성분이 주로 n-부타놀이 이행됨을 관찰하였다.

그 이래 부자의 n-부타놀분획물은 많은 사람들에 의하여 그 강심작용이 확인되어 다방면으로 연구되어 왔으며 디지탈리스강심배당체와는 달리 흰쥐를 포함한 실험동물의 종에 따라 심근수축력 증강효과에 차이를 보이지 않으며, 독작용의 출현도 최초수축증가 용량의 약 1,000배에서나 보여 안전역도 상당히 넓은 것으로 추정되었다(김 1981, 박 1981, 임 1977, 홍 1977, 신 1976, 양 1976, 윤 1976.).

그러나 이러한 연구들은 부자의 주강심성분이 명확히 밝혀지지 못한 상태에서 추출물을 사용하여 행한 연구들이었기 때문에 강심작용의 기전을 세포수준에서 규명하기에는 곤란하였었다. 그러나 최근에 Kosuge 및 Yokota(1976, 1978)등이 부자의 주강심성분이라고 주장하는 순수한 결정성분을 분리하여 Higenamine이라 명명하고 질량분석 결과 $C_{16}H_{17}NO_3 \cdot HCl$ 이고, 그 구조는 dl-1-(4-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro isoquinoline hydrochloride(dl-demethylcoclaurine hydrochloride)이라 보고하였으며 장등(1981)은 가토심방근을 사용한 실험에서 이 Higenamine의 강심작용을 확인하고 특히 심근수축증강작용에 있어서 칼슘과 상호 보완적으로 작용한다고 보고하였다.

심장근 수축기전에 있어서 세포내 유리칼슘이온이 중심적인 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실로서 디지탈리스강심배당체를 위시하여 실험적으로 심근 수축증강작용을 나타내는 물질들의 강심효과는 그것이 어떠한 기전을 통한 것이든지간에 궁극적으로는 세포내 유리칼슘 농도가 증가되는 결과에 기인할 것이라는 것이 많은 학자들에 의하여 받아 들여지고 있다. 한편 이러한 세포내 칼슘은 세포막 및 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria 등 세포내 칼슘 저장기구들에 의하여 조절되며 그중 특히 sarcoplasmic reticulum은 심근의 수축—이완에 따른 세포내 유리 칼슘 이온농도를 조절하는데 있어서 핵심적인 역할을 할 것이라는 것이 현재까지 많은 학자들의 주장이다(Chapman 1979, Ebashi 1976, Fabiato and Fabiato 1975, 1979, Kitazawa 1976).

상기한 바와같이 심근의 수축력은 세포내 유리칼슘 농도의 변화에 따라 다르고, 그 칼슘은 많은 부분이 주로 sarcoplasmic reticulum에 의하여 조절된다고 했을때, Higenamine도 sarcoplasmic reticulum에서의 칼슘 조절기능에 영향을 미침으로서 강심 작용을 나타낼 수도 있을 것이라 생각할 수 있다. 본 연구에서는 Higenamine이 sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수 및 유리능력과 그 칼슘 운반을 주관하는 ATPase활성에 미치는 영향을 관찰하므로써 Higenamine이 나타내는 강심작용의 세포수준에서의 기전을 규명하고자 하였다.

실 험 방 법

1) Sarcoplasmic reticulum의 추출

돼지 심실근에서 약간 변형시킨 Harigaya and Schwartz(1969)방법에 의하여 추출하였다. 심실근에서 지방조직과 결합조직을 제거한 후, 냉각시킨 homogenizing-용액(50 mM Tris-maleate pH 7.0, 5mM NaN_3)에 넣고 가위로 잘게 자른다음 4배 용량의 동일 homogenizing-용액에 넣어 waring blender를 사용하여 40 초 동안 균질화 하였다. 이 homogenate를 3,000×g에서 20분 냉동원심분리한 후 상등액을 4점의 cheese cloth를 통해 여과하여 핵, 결합조직편을 제거한 후 9,000×g에서 20분간 다시 냉동원심분리하여 mitochondria를 제거하도록 하였다. 상등액을 취하여 33,000×g에서 80분 냉동원심분리하여 얻은 잔사를 다시 20 mM Tris-maleate pH 7.0, 50 mM KCl 용액에 부유시켜 33,000×g에서 30분 원심분리 하여, sarcoplasmic reticulum을 얻었다. 이 sarcoplasmic reticulum은 20 mM Tris-maleate pH 7.0, 50 mM KCl 용액에 단백질 농도가 10 mg/ml 되도록 glass-teflon homogenizer를 이용하여 부유시켜 실험에 사용하였다. 위의 모든 조작은 4°C 이하에서 행하였고 단백질 농도는 Lowry 등의 (1951)방법으로 측정하였다.

2) Sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수 및 유리 측정

Sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수 및 유리는 칼슘 indicator인 murexide와 dual-beam spectrophotometer(Aminco-Chance Dual-beam Spectrophotometer, American Instrument Co. U.S.A.)를 이용한 Ohnishi and Ebashi 방법(1963)으로 측정하였다. Murexide(ammonium purpurate)는 중성 pH에서 칼슘에 민

감한 metallochromic dye로서 칼슘과 결합시 파장 470 nm에서 최고, 542 nm에서 최저의 흡광도를 나타내며 507 nm(Isobestic wavelength)에서 유리 murexide와 Ca²⁺-murexide가 동일 흡광도를 보인다. 따라서 murexide를 포함한 반응액내에서의 유리 칼슘농도 변화를 dual-beam spectrophotometer를 사용하여 507 nm와 542 nm(또는 470 nm)의 파장에서 동시에 측정된 흡광도의 차이로부터 계산하였다.

20 mM Tris-maleate pH 7.0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaN₃, 0.2 mM murexide와 0.7~1 mg/ml sarcoplasmic reticulum을 함유한 3 ml의 반응액이 들어있는 cuvette를 30°C에서 10분동안 전처리한 후 15 mM CaCl₂ 10 μl(최종 Ca²⁺농도 50 μM), 20 mM Tris-ATP 15 μl(최종 ATP 농도 0.1 mM)를 순서적으로 첨가하고 파장 507 nm와 542 nm에서의 흡광도 차이를 경시적으로 기록하여 반응액 내에서 sarcoplasmic reticulum이 칼슘을 흡수 또는 유리함으로써 변동되는 칼슘농도를 측정하였다.

Higenamine의 영향을 관찰한 실험에서는 칼슘과 ATP를 넣기 전에 Higenamine 10⁻⁴~5×10⁻³M을 반응액에 첨가하고 역시 30°C, 10분동안 전처리한 후 동일한 방법으로 경시적으로 측정하여 sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수율 및 최대 흡수량, 유리율에 대한 영향을 관찰하였다.

3) Sarcoplasmic reticulum ATPase 활성도 측정

Sarcoplasmic reticulum의 ATPase 활성도는 첨가된 ATP가 ATPase에 의하여 분해되므로써 유리되는 무기인(Pi)을 측정하여 계산하였다. 20 mM Tris-maleate pH 7.0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 0.1 mg/ml sarcoplasmic reticulum을 함유한

반응용액 1 ml을 30°C, 진탕수욕조에서 10분간 전처리 한후에 0.014~1 mM Tris-ATP를 첨가함으로써 반응을 시작하였다. 반응 5분에 15% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 Pi량을 측정하여 총 ATPase활성도를 계산하였다. 한편 반응액 중 CaCl₂ 대신 칼슘 chelator인 ethyleneglycolbis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA)를 1 mM 첨가하여 유리칼슘을 없게한 조건에서 동일한 방법으로 반응시켜 칼슘과 무관한 basal Mg²⁺-ATPase 활성도를 동시에 측정하였으며 총 ATPase 활성도에서 basal Mg²⁺-ATPase를 뺀 값을 Ca²⁺-ATPase 활성도로 하였다. 반응액내에 유리된 Pi 양은 10% TCA를 첨가하여 종료시킨 반응액을 1,000×g, 10분 동안 원심분리하여 취한 상등액에서 stannous chloride에 의한 phosphomolybdate의 환원반응을 파장 660 nm에서 spectrophotometry하는 Horwitz 방법(1952)으로 측정하였다.

실 험 성 적

1) Sarcoplasmic reticulum의 칼슘 운반에 대한 Higenamine의 영향

(1) 칼슘 흡수에 대한 영향: 심장근 sarcoplasmic reticulum의 칼슘 운반능력은 실험동물의 종에 따라 약간의 차이를 보이는데(Harigaya and Schwartz, 1969) 본 연구에서 사용한 돼지 심근 sarcoplasmic reticulum은 50 μM 칼슘 존재하에서 0.1 mM ATP에 의하여 36.4 nmoles/mg protein의 최대흡수(maximal membrane binding)를 나타내었으며, 이는 Ca⁴⁵와 milipore filtration 방법으로 측정된 김등(1982)에서와 유사한 결과였다. 이러한 칼슘 흡수에 대하여 Higena-

Table I. Effect of Higenamine on the Ca⁺⁺-binding of porcine cardiac sarcoplasmic reticulum

	Maximum Binding		Binding Rate**	
	nmoles/mg prot	△%	nmoles/mg prot/min	△%
Control	36.40±1.68*		284.15±10.43*	
Higenamine(M)				
1.0×10 ⁻⁴	32.56±4.97	-10.6	214.87±19.54	-24.4
1.0×10 ⁻³	27.57±3.66	-24.3	201.00±13.27	-29.3
2.5×10 ⁻³	23.32±0.64	-25.9	194.77±18.61	-31.5
5.0×10 ⁻³	21.23±3.97	-41.7	160.71±14.20	-43.3

*: Mean±S.E. The values are estimated from the experiments as Fig. 1.

** : Binding rates were estimated from the value measured at 4 seconds after addition of ATP.

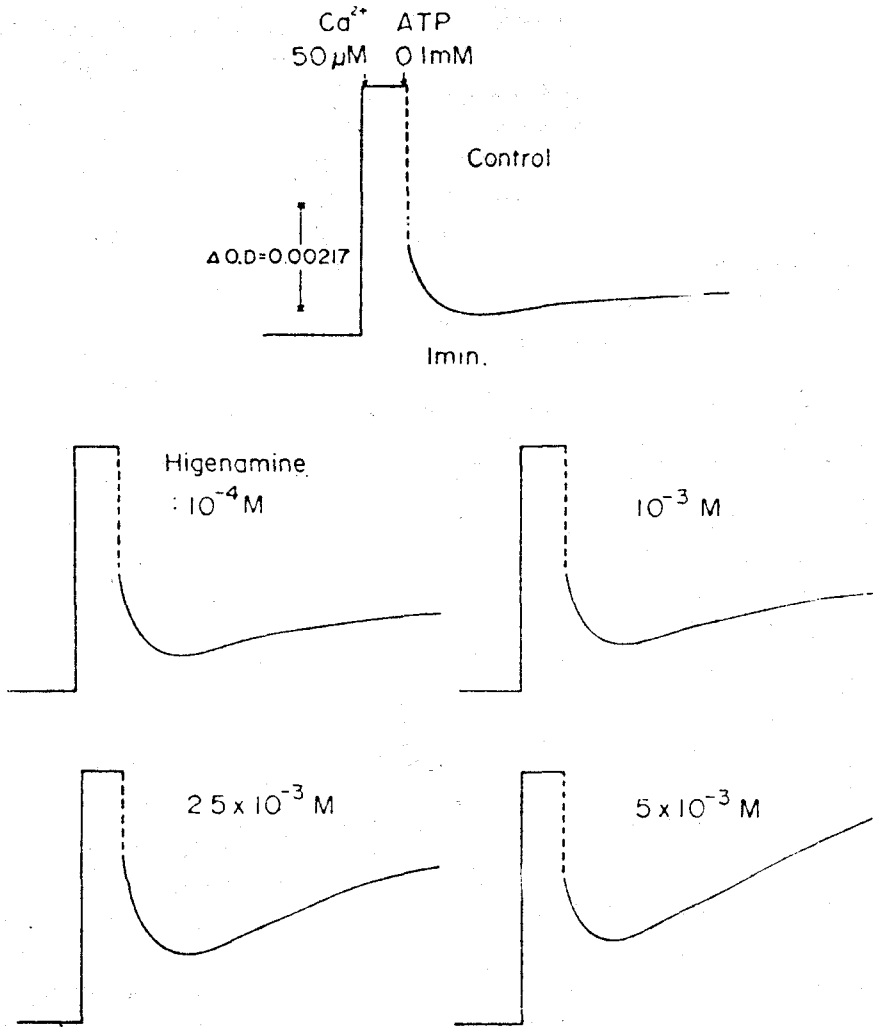


Fig. 1. Calcium binding and release of sarcoplasmic reticulum measured by dual-beam spectrophotometry. The rate and extent of calcium binding and release of porcine cardiac sarcoplasmic reticulum were measured through the absorbance changes of calcium sensitive dye, murexide, at 507-542 nm in a 3 ml cuvette. The reaction mixture contained 20 mM Tris-maleate pH 7.0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaN₃, 50 μM CaCl₂, 0.2 mM murexide and 1 mg of SR prot/ml. The reaction was initiated by the addition of 0.1 mM Tris-ATP. Before the start of the reaction the reaction mixture was preincubated for 10 min at 30°C with or without 10⁻⁴~5×10⁻³M Higenamine.

mine은 농도를 증가함에 따라 용량 의존적인 억제를 나타내었으며, Higenamine 5×10⁻³M의 경우 최대흡수가 21.2 nmoles/mg protein으로 대조에 비해 41.7%의 억제를 보였다(Fig. 1 and Table 1).

본 실험에서와 같이 sarcoplasmic reticulum 막을 자유로이 통과하는 음이온들(phosphate, oxalate)이 존재하지 않는 조건에서 일어나는 칼슘 흡수(vesicular membrane binding)반응은 Fig. 1에서와 같이 대단히

빠른 속도로 일어나므로 본 실험에서는 ATP첨가후 흡광도 변화를 관찰할 수 있는 최단시간인 4초의 흡수 반응속도를 측정하여 초기 흡수율로 계산하였다.

Table 1에서 처럼 Higenamine을 첨가하지 않은 대조실험에서 284.2 nmoles/mg prot/min를 나타낸 흡수율이 Higenamine에 의하여 농도 증가에 따라 최대 흡수에서의 같은 정도로 현저히 억제되었으며, 최고 Higenamine 농도인 5×10⁻³M에서는 160.7n moles/mg

prot/min 로 대조 흡수율에 대하여 43.4%의 억제를 보였다.

(2) 칼슘 유리에 대한 영향 : 심근 sarcoplasmic reticulum 은 ATP 첨가후 시간경과에 따라 칼슘을 최대로 흡수한 후 다시 흡수했던 칼슘의 일부를 자연적으로 유리한다(Fig. 1). Table 2에서와 같이 대조 sarcoplasmic reticulum 에서 1.5 nmoles/mg prot/min 를 보인 칼슘 유리가 Higenamine 에 의하여 촉진되었으며 $5 \times 10^{-3}M$ 의 경우 유리율이 4.7 nmoles/mg prot/min 로 대조에 비하여 약 3배가 증가된 결과를 보였다.

Table II. Effect of Higenamine on the Ca^{++} release from cardiac sarcoplasmic reticulum

	Release Rate*	
	nmoles/mg prot/min	△%
Control	1.54±0.38	
Higenamine(M)		
1.0×10^{-4}	1.85±0.44	+ 20.1
1.0×10^{-3}	2.47±0.43	+ 60.4
2.5×10^{-3}	3.15**	+104.5
5.0×10^{-3}	4.66±0.41	+202.6

*: Mean±S.E.

The values were estimated from the experiments as in Fig. 1.

** : The value represents the average of 3 experiments from different preparations.

Table III. Effect of Higenamine on the ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum

	Mg ⁺⁺ -ATPase		Ca ⁺⁺ -ATPase	
	μmoles Pi/mg prot/hr	△%	μmoles Pi/mg prot/hr	△%
Control	22.50±0.15*		3.75±0.04*	
Higenamine(M)				
1.0×10^{-4}	21.69±0.60	- 3.60	3.55±0.10	- 5.33
1.0×10^{-3}	20.47±1.67	- 9.02	2.74±0.11	-26.93
5.0×10^{-3}	14.39±0.20	-36.04	1.61±0.04	-57.07

*: Mean±S.E.

Porcine cardiac sarcoplasmic reticulum (0.1 mg/ml) was preincubated with or without $10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3}M$ Higenamine for 10 min at 30°C in 1 ml of medium containing 20 mM Tris-maleate pH 7.0, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaN₃ and either 50 μM CaCl₂ (for total ATPase) or 1 mM EGTA (for Mg⁺⁺-ATPase). After the preincubation the reaction was started by the addition of 1 mM Tris-ATP. The reaction was terminated by the addition of 0.25 ml of 15% TCA at 5 min after the initiation of the reaction and Pi liberated was determined spectrophotometrically by the method of Horwitt. Ca⁺⁺-ATPase activity was calculated by the subtraction of Mg⁺⁺-ATPase from the total ATPase.

2) Sarcoplasmic reticulum ATPase 활성도에 대한 Higenamine 의 영향

실험방법에서 언급한대로 1 mM EGTA 를 첨가하여

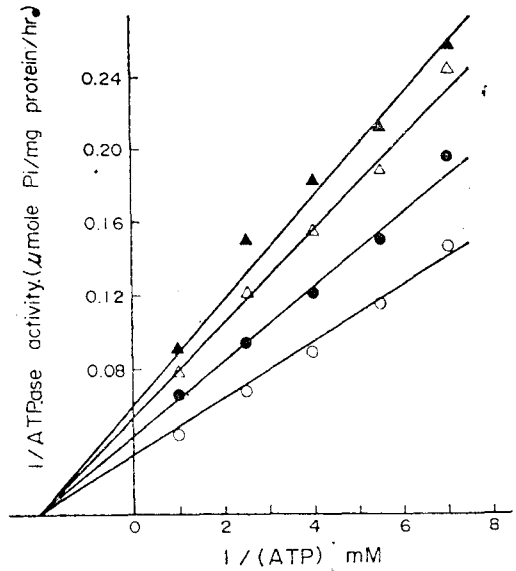


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of Mg⁺⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. The reaction conditions were the same as in Table III except the added concentration of Tris-ATP (0.014~1 mM). Control (○), Higenamine, $2.5 \times 10^{-3}M$ (●), $5 \times 10^{-3}M$ (△), and 10^{-2} (▲).

Table IV. Inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase by Higenamine*

	Mg ²⁺ -ATPase	Ca ²⁺ -ATPase
K _m (ATP)**	0.459 mM	0.053 mM
K _i (Higenamine)***	6.875 mM	4.896 mM

*: The values were calculated from the experiments as in Fig. 2, 3, 4 and 5.

** : ATP concentration producing half-maximal stimulation of ATPase activity

*** : Higenamine concentration for half-maximal inhibition of ATPase activity

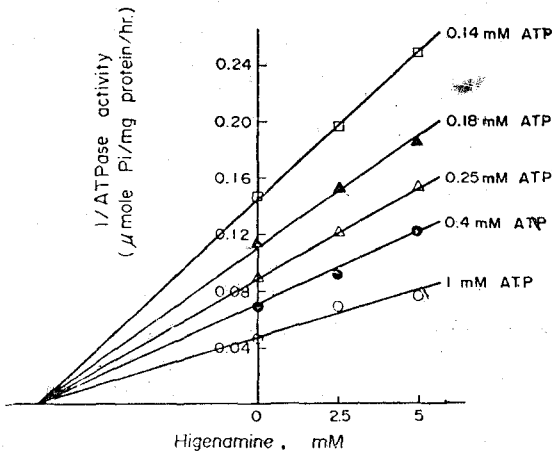


Fig. 3. Dixon plot of Higenamine inhibition on Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. Reaction conditions are the same as in Fig. 2.

반응액내 유리칼슘을 없애고 Mg²⁺만이 존재하는 상태에서 측정한 basal Mg²⁺-ATPase와, Ca²⁺ 및 Mg²⁺이 전부 존재하는 조건에서 측정한 총 ATPase(total ATPase)와의 차이로 계산되는 Ca²⁺-ATPase 활성도를 동시에 측정하였다. ATPase 활성도에 대한 Higenamine의 영향을 역동학적으로 분석하기 위하여 ATP의 분해가 첨가한 양의 10%이내가 되도록 반응시간을 조절하고 그때의 초기 ATP분해속도를 측정하였다. Table 3 및 Fig. 2, 4에서와 같이 Ca²⁺-ATPase 및 Mg²⁺-ATPase는 50 μM Ca²⁺, 1 mM ATP가 존재하는 조건에서 각각 3.75 μmoles Pi/mg prot/hr와 22.5 μmoles Pi/mg prot/hr의 대조 활성도를 나타내었으며, ATP 농도 변화에 따른 활성도의 변화는 Michaelis 방정식을 따르는 양상을 보였고 이때 K_m치(최고 ATPase 활성도의 50%를 활성화하는 ATP 농도)는 각각 0.053 mM과 0.459 mM이었다(Table 4).

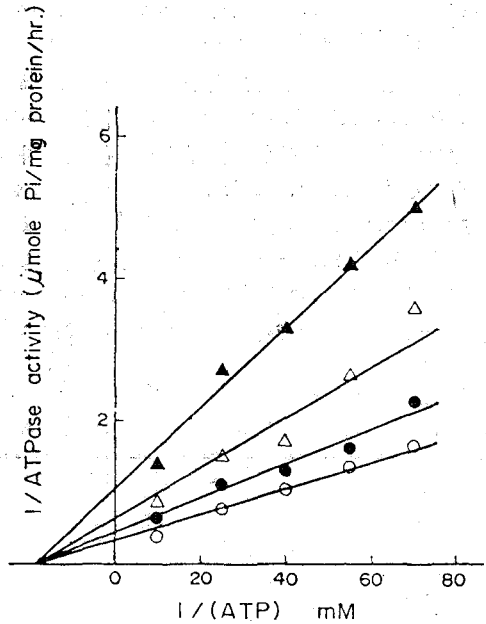


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. The reaction conditions were the same as in Table III except the added concentration of Tris-ATP (0.014~1 mM). Control(○), Higenamine, 2.5×10⁻³M(●), 5×10⁻³M(△), 10⁻²M(▲).

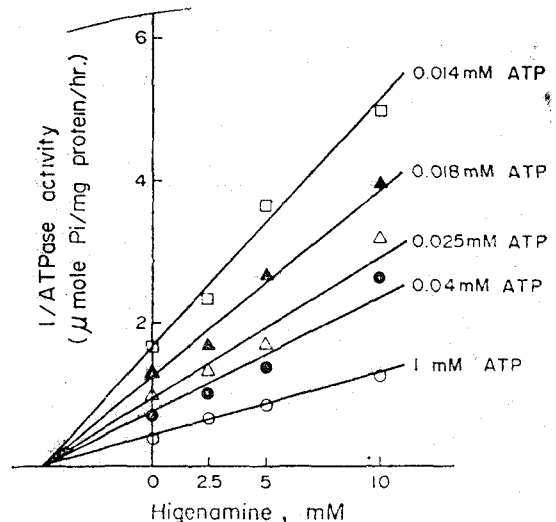


Fig. 5. Dixon plot of Higenamine inhibition on Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. Reaction as in Fig. 4.

한편 Higenamine은 Ca²⁺-ATPase 및 Mg²⁺-ATPase 활성을 다같이 용량 의존적으로 억제하여 Higenamine 5×10⁻³M에서의 활성도는 대조값에 비하여 Ca²⁺-

ATPase가 57.1%, Mg^{2+} -ATPase가 36.0% 억제되었다.

이와같은 Higenamine의 ATPase의 억제는 Higenamine의 농도를 증가함에 따라 K_m 치에는 변화가 없고 최고분해속도(V_{max})만이 감소하는 비상경적인 억제 양상을 보였으며 K_i 치(최대 ATPase활성 억제의 50%에 이르게 하는 Higenamine의 농도)는 Ca^{2+} -ATPase에서 4.896 mM, Mg^{2+} -ATP에서 6.875 mM로 Ca^{2+} -ATPase가 Higenamine에 의하여 더 높은 정도로 억제되었다.

고 찰

심근 수축기전의 세포막 흥분—수축연결과정(Excitation-contraction coupling)에서 세포내 유리칼슘이온이 절대적이고, 중심적인 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이다. 즉 이완시에 $10^{-8} \sim 10^{-7}M$ 이던 세포내 유리 칼슘 농도가 근세포막의 탈분극에 이어 수축이 일어나기 시작할 때에는 $10^{-5}M$ 로 증가하여 근단백질중 칼슘에 민감한 troponin C에 그 칼슘이 결합하므로써 수축단백질인 actin과 myosin의 상호연결을 가능하게 하여 수축을 일으키며, 이 칼슘이 다시 troponin C로부터 떨어져 나와 세포내부의 칼슘 저장소에 축적되거나, 세포외로 유리되어 나가 칼슘 농도가 낮아지므로써 이완이 일어난다(Ebashi 1976, Fozzard 1977). 이와같이 근수축에 필수적인 세포내 유리칼슘의 농도는 근세포막과 세포내 기구들인 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 및 기타 칼슘 결합 단백질 등의 복합적인 작용에 의하여 조절될 것으로 받아들여지고 있으며 그중 sarcoplasmic reticulum에 의한 조절이 많은 학자들에게 특히 중요시되고 있다(Chapman 1979, Ebashi 1976, Fabiato and Fabiato 1975, 1979, Kitazawa 1976).

Sarcoplasmic reticulum에서는 막에 존재하는 Ca^{2+} -ATPase가 ATP를 분해하는 것과 연관되어 정량적으로 ATP 1 mole 당 2개의 칼슘 이온이 막내외로 운반되며, Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 은 ATPase활성을 또한 조절하게 된다. 따라서 sarcoplasmic reticulum은 Mg^{2+} 존재에서 Mg^{2+} -dependent Ca^{2+} -ATPase의 활성화로 근이완시에는 칼슘을 축적하는 저장고로서, 수축시에는 칼슘 유리원으로서의 역할을 하므로써 근수축에 이용 가능한 세포내 유리 칼슘 농도를 조절하는 것으로 받아들여지고 있다(Hasselbach 1978, Martonosi 1975, Martonosi et al 1978).

Higenamine이 강력한 심근 수축 증가 효과를 나타낸다고 알려진 부자 n-부타놀분획의 주 강심 성분임이 밝혀진 이후(Kosuge and Yokota 1976, 1978) 장동(1981)은 적출 가토 심방근에서 Higenamine의 현저한 강심 효과를 확인하였으며 특히 칼슘과의 상호 관계에서 보았을 때 Higenamine $10^{-7}g/ml$ 는 칼슘 $58 \mu M$ 과 동등한 심근 수축 증강 효과를 나타냄으로서 부자 n-부타놀 분획보다 약 1,000배 더 강력한 강심작용을 갖는다고 하였다. 또한 이들은 같은 보고에서 세포막을 통한 칼슘이동을 차단하는 verapamil, La^{2+} 에 의하여 억제된 심근 수축력을 Higenamine이 다시 회복시킨다는 점에서 세포막을 통한 세포외액으로부터 내부로의 칼슘 유입을 촉진하는 것이 강심작용 기전의 일부가 될 수 있으리라고 추정하면서 Higenamine은 심근 수축시 세포내 칼슘농도를 증가시킬 수 있을 것임을 시사하였다. 그러나 이들은 시사한 바와 같은 칼슘 농도의 증가를 세포 수준에서 증명할 수 있는 보다 구체적인 증거는 제시하지 못하였다. 본 실험결과 상기한 바와 같이 세포내 칼슘 농도를 조절하므로써 심근의 수축—이완에 있어서 큰 역할을 하는 sarcoplasmic reticulum의 칼슘운반에 대하여 Higenamine은 칼슘의 최대 흡수 및 초기 흡수율은 억제하고 반대로 유리는 촉진하였는 바 이러한 현상중 특히 흡수의 억제는 Ca^{2+} -ATPase활성의 억제와도 부합되므로써 Higenamine에 의한 강심작용의 일부는 Ca^{2+} -ATPase억제에 따라 sarcoplasmic reticulum에로의 칼슘축적이 억제되고, 동시에 sarcoplasmic reticulum내부에 존재하던 칼슘은 외부로 유리되어 나오므로써 세포내에 유리상태로 존재하는 심근 수축시 이용 가능한 칼슘농도가 높아지는 데에 기인할 수도 있으리라 여겨졌다. 한편 Ca^{2+} -ATPase활성이 Higenamine에 의하여 비상경적으로 억제(K_i , 4.896 mM)되는 것과 더불어 basal Mg^{2+} -ATPase도 그 정도는 약간 낮으나 역시 비상경적인 억제(K_i , 6.875 mM)를 하였는데, 이로부터 Higenamine은 아마도 Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 존재에 의하여 sarcoplasmic reticulum 막 ATPase가 인산화(磷酸化)되어 활성화되는 과정을 억제하거나, 또는 ATPase인산 결합물의 탈인산화(脫磷酸化)과정을 억제하지 않을까 생각하였다.

또 한편 흡수반응의 억제와는 반대로 이에 흡수되어 있던 칼슘은 그 유리가 Higenamine에 의하여 현저히 촉진되므로써 sarcoplasmic reticulum 막을 통한 내부에서 외부로의 칼슘 투과성이 증가된 것과 같은 결과를 보였는데 이러한 현상은 Ca^{2+} -ATPase억제에 따른 sarcoplasmic reticulum 막의 ATP 의존성인 소위 "Cal-

cium-Pump의 역전환"에 의한 현상일 수도 있으며, 또는 Ca^{2+} -ATPase와는 별개의 다른 유리기전을 통한 촉진일 수도 있겠다. 그러나 현재로서는 단언을 할 수는 없지만 칼슘농도에 따른 Higenamine의 영향을 관찰한 일부 실험결과에 의하면 칼슘 흡수반응후 반응액에 잔존하는 칼슘농도가 높을수록 Higenamine에 의한 칼슘유리가 증가되는 양상을 보여줌으로서 후자의 Ca^{2+} -ATPase와는 무관한 유리 기전, 특히 "칼슘에 의한 칼슘 유리 기전"(Endo 1977, Fabiato and Fabiato 1975, 1979)의 촉진을 통한 현상일 수도 있으리라 추측하였다.

결론 및 요약

심근 수축력을 현저히 증가시키는 부자 n-부타놀 분획의 주강심 성분으로 밝혀진 Higenamine의 강심 작용기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 심근 sarcoplasmic reticulum에서 칼슘 운반과 이를 주관하는 ATPase활성도에 미치는 Higenamine의 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 심근 sarcoplasmic reticulum의 최대 칼슘 흡수 및 초기 흡수율은 Higenamine이 용량 의존적으로 억제하였다.

2) 심근 sarcoplasmic reticulum에서의 칼슘유리는 Higenamine에 의하여 용량 의존적으로 촉진되었다.

3) Sarcoplasmic reticulum의 Ca^{2+} -ATPase 및 basal Mg^{2+} -ATPase는 Higenamine이 다같이 비경쟁적으로 억제하였고 K_i 치는 각각 4.896 mM과 6.875 mM이었다.

이상에서 Higenamine에 의한 강심작용의 일부는 sarcoplasmic reticulum에서의 칼슘 운반에 필수적인 Mg^{2+} -dependent Ca^{2+} -ATPase활성을 억제함에 따라 sarcoplasmic reticulum에로의 칼슘흡수를 억제하고, 동시에 sarcoplasmic reticulum으로부터의 칼슘유리는 촉진하므로써 심근 수축시에 이용 가능한 세포내액의 유리 칼슘 농도를 증가시킨 것에 기인할 것으로 생각하였다.

REFERENCES

김광철, 홍사악, 박찬웅 : 부자에서의 강심작용 물질 검색에 관한 연구. 최신의학, 12(12):77, 1973.
김명석, 김용식 : 부자 강심 성분의 작용기전에 관한 연구. 대한약리학잡지, 17(1):9-15, 1981.

김혜원, 김명석, 박찬웅 : 심장근 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca^{+} 과 Na^{+} 에 의한 Ca^{2+} 유리작용. 서울의대학술지, 23(1):7-16, 1982.

박찬웅, 김명석 : 부자의 강심작용에 대한 약리학적 검토. 서울의대학술지, 22(1):1-14, 1981.

신상구, 임정규, 박찬웅, 김명석 : 부자 부타놀 분획이 심장근 Microsomal Na^{+} - K^{+} -ATPase활성도에 미치는 영향. 대한약리학잡지, 12(1):7-14, 1976.

양길승, 박길수, 박찬웅, 임정규 : 부자 부타놀 분획이 심근 수축 단백질에 미치는 영향. 대한약리학잡지, 12(1):23-29, 1976.

윤 충 : 수중 강심약물과 부자 부타놀 분획이 심장근의 기계적 성질에 미치는 영향. 대한약리학잡지, 12(1):45-55, 1976.

임정규, 김명석, 신상구, 박찬웅 : 수축빈도에 따른 수중 강심약물 및 부자 부타놀 분획의 강심효과 분석. 대한약리학잡지, 13(2):1-9, 1977.

장기철, 임정규, 박찬웅, 김명석 : Higenamine의 강심작용 기전에 관한 연구- Ca^{2+} 과의 상호작용-대한약리학잡지, 17(2):7-16, 1981.

홍사악, 김명석, 박찬웅 : 부자 부타놀 분획의 강심작용에 대한 Potassium이온의 효과. 대한약리학잡지, 13(2):11-17, 1977.

矢數四郎 : 東亞産 Aconite根(烏頭, 附子)의 藥理學的 研究及び治療應用の 檢討. 日藥理誌, 54:880, 1958.

Chapman, R.A.: Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. Prog. Biophys. Molec. Biol., 35:1-52, 1979.

Ebashi, S.: Excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol. 38:293-313, 1976.

Endo, M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev., 57:71-108, 1977.

Fabiato, A. and Fabiato, F.: Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J. Physiol., 249:469-495, 1975.

Fabiato, A. and Fabiato, F.: Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol., 41:473-484, 1979.

Fozzard, H.A.: Heart excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol., 39:201-220, 1977.

Harigaya, S., Schwartz, A.: Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing

- human cardiac muscle. *Cir. Res.*, 25:781-794, 1969.
- Hasselbach, W.: The reversibility of the sarcoplasmic calcium pump. *Biochem. Biophys. Acta.*, 515: 23-53, 1978.
- Horwitt, B.N.: Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J. Biol. Chem.* 199:537-541, 1952.
- Kitazawa, T.: Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.*, 80:1129-1147, 1976.
- Kosuge, T., Yokota, M.: Studies on cardiac principle of Aconite root. *Chem. Pharma. Bull.*, 24(1):176-178, 1976.
- Kosuge, T., Yokota, M., Nagasawa, M.: Studies on cardiac principle in Aconite root. I. Isolation and structural determination of Higenamine. *Yakugaku Zasshi*, 98(10):1370-1375, 1978.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:266-275, 1951.
- Martonosi, A.N.: The mechanism of calcium transport in sarcoplasmic reticulum: In calcium transport in contraction and secretion. Amsterdam, North-Holland Publishing Co., pp. 319-327, 1975.
- Martonosi, A.N., Chyn, T.L., Schibec, A.: The calcium transport of sarcoplasmic reticulum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:148-159, 1978.
- Ohnishi, T., Ebashi, S.: Spectrophotometrical measurement of instantaneous calcium binding of the relaxing factor of muscle. *J. Biochem.*, 54 (6): 506-511, 1963.

Acknowledgement

We are deeply indebted to Dr. Takuo Kosuge and Dr. Masami Yokota, Shizuoka College of Pharmacy, Shizuoka, Japan for their kind supply of Higenamine, which made for us to accomplish this research work successfully.

Higenamine을 供給해 주어서 이 연구를 成功的으로 遂行할 수 있게해 준 日本静岡薬学大学 Takuo Kosuge 博士, Masami Yokota 博士의 厚意에 深甚한 感謝를 드립니다.