

쥐 心筋 細胞의 [^3H] Ouabain 結合과 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 攝取에 미치는 Ouabain의 影響

李 神 雄 · 金 英 姬 · 陳 甲 德

嶺南大學校 藥學大學

(Received February 5, 1984)

[^3H] Ouabain Binding and Effect of Ouabain on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Uptake in Rat Cardiac Myocytes

Shin Woong Lee, Yeung Hee Kim and Kap Duck Jin

College of Pharmacy, Yeung Nam University, Gyongsan 632, Korea

Abstract—Specific [^3H] ouabain binding and Ca^{2+} -uptake were measured to elucidate the role of high affinity [^3H] ouabain binding site in rat cardiac myocytes which contain 65% of rod cells. High affinity [^3H] ouabain binding site, which is about 3% of total pump sites, with apparent dissociation constant (K_D) of $1.1 \times 10^{-7}\text{M}$ and maximum binding site concentration (B_{max}) of 1.2 pmol/mg protein (1.754×10^5 cells) were identified. At the concentration of 10^{-7}M to 10^{-4}M , ouabain produced concentration-dependent increase in Ca^{2+} -uptake of myocytes. The effect of ouabain on Ca^{2+} -uptake was not effected by membrane depolarization (elevated K^+ in incubation medium) or verapamil. These results suggest that in rat ventricular myocytes the ouabain receptor complex to high affinity site may increase Na^+ - Ca^{2+} exchange across the sarcolemmal membrane by inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase.

Digitalis glycosides의 作用機轉에 관해서는 아직도 不明한 점이 많으나¹⁾ 대부분의 논문들은²⁻⁷⁾ digitalis glycosides가 Na^+ , K^+ -ATPase를 억제하여 心臟收縮力을 증가시킬 것으로 추정하고 있다.

Na^+ , K^+ -ATPase는 cardiac glycosides에 대한 특수한 결합부위를 가지고 있으며⁸⁻⁹⁾이 부위에 cardiac glycosides가 결합하면 이 효소의 활성이 억제되어 세포내 Na^+ 농도가 증가되고 이에 따라 세포막을 통한 Na^+ - Ca^{2+} 교환이 촉진됨으로써 細胞內 Ca^{2+} 농도가 증가되는 것으로 알려지고 있다.⁹⁻¹⁰⁾ 그러나 근래에 와서 ouabain의 농도가 적을 때는 ouabain 結合과 Na^+ , K^+ -ATPase의 活性抑制가 일치하지 않는 경우를 관찰하여 Na^+ , K^+ -ATPase에 한 종류이상의 ouabain 結合部位가 있을 것으로 看做한 논문들이 많이 발표되고 있다. 즉 Wellsmith等¹¹⁾은 개 心室 sarcolemma에 두 종류의 ouabain 結合部位가 있음을 보고한 바 있고, Erdmann等¹²⁾, Sharma等¹³⁾, Fricke等¹⁴⁾, 및 Sweadner¹⁵⁾도 각각 rat 心臟, guinea pig 心臟 또는 rat brain에 두 종류의 ouabain 結合部位가 있음을 보고한 바 있다. 뿐만아니라 著者等¹⁶⁾은 rat 心室筋에서 ouabain이 두가지 樣相의 收縮增加作用을 나타내며 고농도 ouabain으로서는 Na^+ , K^+ -ATPase를 억제하나 저농도 ouabain으로서는 이 酵素活性에 有意義한 억제를 일으키지 않음을 관찰하여 ouabain의 low affinity site, 즉 고농도 ouabain의 收縮力增加作用은 Na^+ , K^+ -ATPase의 억제와 관계가 있으나 저농도 ouabain의 반응(high affinity response)에 관해서는 그 機轉을 밝히지 못하였다.

본 실험에서는 rat 心室 sarcolemma에서 관찰된 high affinity ouabain 結合部位가 intact cell에

는 없던 것이 sarcolemma 分離過程中에 $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ 의 어떤 성질이 변화하여 생긴 것인지 또는 실제로 존재한다면 細胞膜의 $\text{Na}^+\text{-pump}$ 에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 rat 心室로부터 intact cell에 가까운 세포를 분리하고, 이 세포에 대한 $[^3\text{H}]$ ouabain 結合과 이 세포의 Ca^{2+} 攝取에 미치는 ouabain의 영향을 관찰하므로써 저농도 ouabain의 心臟收縮力 增加作用의 機轉에 관한 知見을 얻고자 하였다.

實驗方法

實驗動物 및 試藥—1) 實驗動物: 외관상 건강한 Wister系 rat (體重: 250~300g)을 일정한 실험실에서 동일 조건으로 2주이상 사육하여 사용하였다.

2) 試藥: 사용한 시약은 crude collagenase (Type I, *Cl. histolyticum*, Worthington Biochem. Corporation), bovine serum albumin (Type F, Miles Lab., Pentex, Fraction V), ouabain octahydrate (Sigma), $[^3\text{H}]$ ouabain (19.5Ci/mmol, New England Nuclear Co., Boston, MA), $[r\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (25~45Ci/mmol, New England Nuclear Co., Boston, MA), $^{45}\text{CaCl}_2$ (10mCi/ml, New England Nuclear Co., Boston, MA) 등이었다.

心室細胞의 製造—Rat의 心室筋 細胞(ventricular myocytes)는 Powell과 Twist의 방법¹⁷⁾으로 제조하였으며 단위 용적당 세포수는 血球計測器(haemocytometer)로 산출하였다. Protein 농도는 細胞 浮游液 0.5ml를 1M NaOH 1.5ml에 가하고 4°C에서 12시간 방치한 다음 다시 1M HCl 1.5ml를 가한 후 Lowry 방법¹⁸⁾에 準하여 측정하였다.

$[^3\text{H}]$ Ouabain 結合實驗—心筋細胞와 $[^3\text{H}]$ ouabain과의 결합실험은 37°C에서 濾過法¹⁹⁾에 의하였다. 반응액은 心筋細胞의 培養液과 같은 albumin함유 Kreb's Ringer液(mmol/l) (NaCl , 120.5; NaHCO_3 , 13.1; KCl , 2.6; KH_2PO_4 , 1.18; MgSO_4 , 1.18; Glucose, 11.1)으로서 ml당 myocyte액 0.2ml(0.2~0.4mg protein)를 함유하였다. Myocyte를 $[^3\text{H}]$ ouabain (100nM)과 일정 시간 반응시킨후 혼합액 0.9ml를 취하여 0.45 μm methylcellulose filter (Gelman) 위에서 여과하였다. 여지를 빙냉의 100mM KCl 5ml로 3회 세척하고 10ml의 scintillation液 (Budget solv.) 중에 넣어 10시간 이상 방치한 후 liquid scintillation counter (Beckman LS 200B)로 radioactivity를 측정하였다. Nonspecific radioactivity는 같은 조건에서 1mM unlabeled ouabain 존재하에서 측정되었으며 이때 nonspecific radioactivity는 總 radioactivity의 20% 이하였다. $[^3\text{H}]$ ouabain의 특이 결합에 의한 specific radioactivity는 總 radioactivity에서 nonspecific radioactivity를 뺀 값으로 하였다.

心室細胞의 $\text{Na}^+\text{-dependent Phosphorylation}$ —본 실험은 心室細胞를 sodium dodecylsulfate (SDS)로 처리한 후 시행하였다. 즉 心室細胞 浮游液을 glass homogenizer중에 넣고 teflon pestle을 4회 통과(80% max. 140W)시킨 다음 SDS(0.025w/v%)를 가하고 0°C에서 20분간 incubation 하였다. Phosphorylation은 0°C에서 행하였으며 SDS-처리 homogenate 0.03ml(0.03~0.06mg protein)와 30mM histidine(pH 7.4), 100mM NaCl, 및 3.6mM MgCl_2 를 함유한 medium에 100 μM 의 $[r\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP를 가하며 최종 용적이 0.5ml가 되게 하였다. 인산화반응은 $[r\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP를 가한후 정확히 15초가 지났을때 빙냉의 세척액(12.5% trichloroacetic acid, 1mM phosphoric acid, 1mM Na_2ATP) 5ml를 가하여 종료시켰으며 빙수중에 10분간 방치한 다음 0.45 μm methylcellulose filter (Gelman)상에서 여과하였다. 여지를 5ml의 세척액으로 3회 세척하고 scintillation 액중에 넣어 radioactivity를 측정하였으며, 같은 조건에서 5mM unlabeled ATP 존재하에서 측정

된 radioactivity를 nonspecific radioactivity로 看做하였다.

心室細胞의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Uptake—Myocyte의 Ca^{2+} -uptake는 millipore 여과법¹⁹⁾에 의하여었다. Myocyte(0.1ml/ml, 0.1~0.2mg protein/ml)를 $40\mu\text{M}$ $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 함유한 Lock 液 (140mM NaCl, 3.4mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1.25mM CaCl_2 , 5.5mM glucose) 중에서 37°C 에서 주어진 시간동안 incubation한 후 $0.45\mu\text{m}$ methylcellulose filter 상에서 여과하고 5ml의 세척액(200mM KCl, 5mM MOPS/Tris·Cl, 0.1mM EGTA, pH7.4)으로 4회 여지를 세척한 다음 radioactivity를 측정하였다. 상기 medium에 myocyte만을 가하지 않은 용액을, 동일 조건에서 여과 및 세척하여 얻은 radioactivity를 background radioactivity로 看做하였으며 이 background radioactivity는 總 radioactivity의 5%를 초과하지 않았다. Ouabain과 verapamil이 Ca^{2+} -uptake에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 myocyte를 ouabain 및 verapamil과 각각 30분 또는 20분 동안 접촉시킨 후 사용하였다.

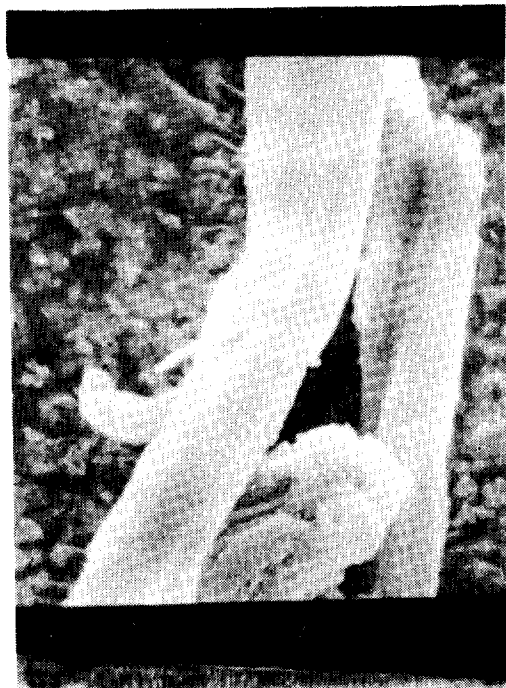
實 驗 結 果

心室筋 細胞의 形態—Rat 心室로부터 분리한 세포의 약 65%는 정상 조직 세포와 유사한 기다란 막대형(rod shape)으로서 활동(beat)하고 있었으며 약 35%는 구형(round shape)으로서 세포의 收縮 또는 構造的 障礙를 받은 것이었다. Fig. 1-A는 rat 心室에서 분리한 세포 부유액을 光學顯微鏡으로 관찰한 것이며 Fig. 1-B, C는 電子顯微鏡상에서 막대형과 구형의 세포를 관찰한 것이다. 막대형 세포의 표면에는 수 많은 능선(longitudinal ridges)과 세포의 긴 축과 수직으로 배열되어 있는 transverse microridge를 볼 수 있으나 구형의 세포는 정상적인 형태가 아니었다. 이는 분리 과정에서 세포가 장애를 받아 강하게 수축되었거나 파괴된 것으로 추측된다.

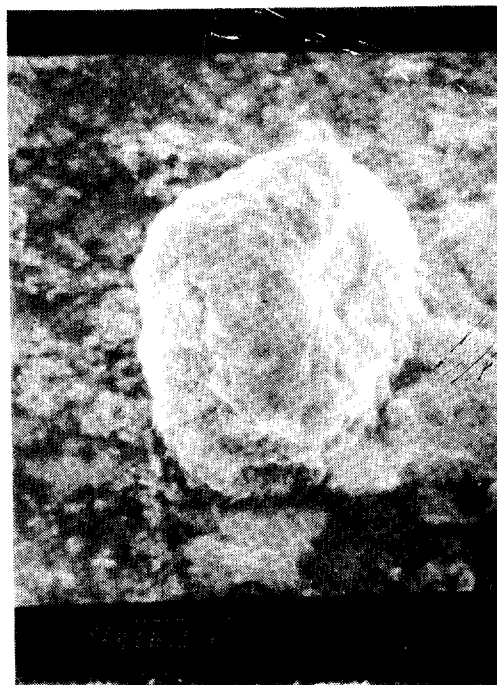
心室筋 細胞의 $[^3\text{H}]$ Ouabain 結合— Na^+ , K^+ -ATPase에 대한 ouabain 結合은 생체내에 존재하는 생리 ligand에 따라 차이가 있으며 이러한 ligand들은 ouabain 結合의 rat constant에도 영향을 미친다. 본 실험에서는 心室筋細胞 제조시 Kreb's-Ringer액이 사용되었으므로 이 용액중에 心室筋細胞를 浮游시켜 $[^3\text{H}]$ ouabain 結合 실험을 시행하였다. Fig. 2A는 시간 경과에 따른 $[^3\text{H}]$



Fig. 1- A: Light micrograph of isolated cell from rat heart($\times 425$). Most cell are elongated, however round cells are also present.



B: Scanning electron micrograph of typical rod shaped cell showing longitudinal ridges and transverse microridges ($\times 1,500$).



C: Scanning electron micrograph of round cell having no organized morphology ($\times 1500$).

ouabain 結合을 본 것으로 心室筋細胞는 $[^3\text{H}]$ ouabain과 빠른 속도로 결합하여 30분에 평형에 도달하였다. 본 실험에서 ouabain의 평형 결합은 약 $0.9 \text{ pmol/mg protein}$ 이며 측정에 사용된 medium 용량(1ml)과 단백질량(0.2mg)을 기준으로 계산할때 결합에 소용된 ouabain은 약 0.18nM 로서 사용한 ouabain 농도($100\sim 200\text{nM}$)보다 훨씬 적으므로 결합반응은 pseudo-first order kinetics

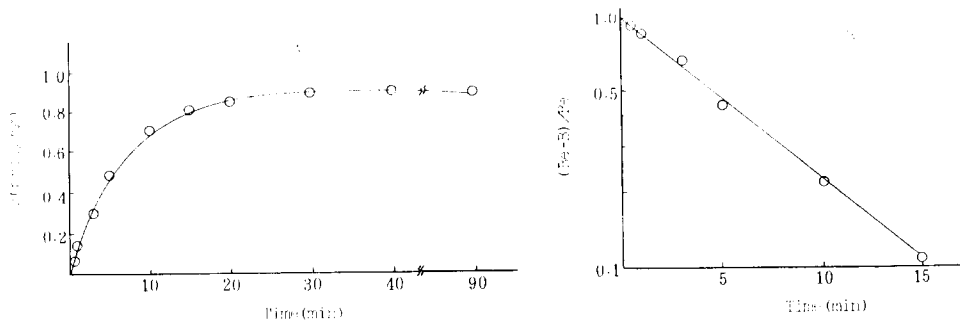


Fig. 2- A: Time course of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to rat cardiac myocytes. Binding was performed in the Kreb's-Ringer solution as described in Methods at $200\text{nM}[^3\text{H}]$ ouabain. B: Pseudo-first-order binding of $[^3\text{H}]$ ouabain to rat cardiac myocytes replotted from data of Fig. 2A ($(B_{\infty}-B_t)/B_{\infty}$) versus time is shown, where B_{∞} and B_t are radioligand bound to Na^+ , K^+ -ATPase at equilibrium and at time t , respectively.

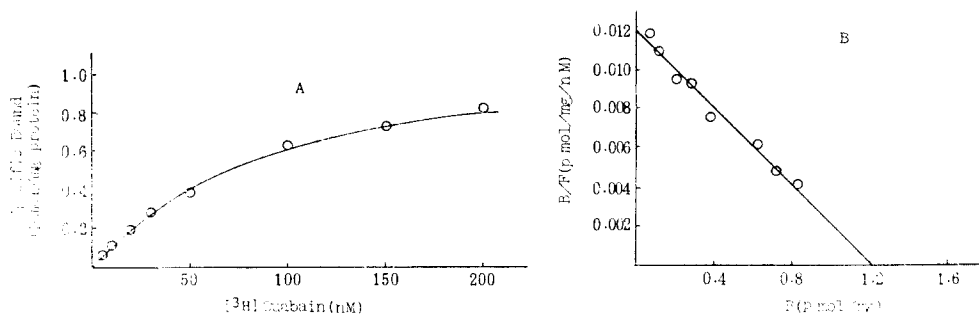


Fig. 3- A: Equilibrium binding of $[^3\text{H}]$ ouabain to rat cardiac myocytes. Each point was plotted as specific bound(B) as a function of increasing $[^3\text{H}]$ ouabain concentration. Myocytes were incubated in the presences of 5~200nM $[^3\text{H}]$ ouabain in Kreb's-Ringer solution for 90 min prior to filtering.

B: Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to rat cardiac myocytes. Bound $[^3\text{H}]$ ouabain to free $[^3\text{H}]$ ouabain (B/F) is plotted as a function of specific $[^3\text{H}]$ ouabain bound(B) to myocytes (pmol/mg). Each point denotes mean from 5 different preparations.

에 해당된다. Fig. 2B에서 ouabain 결합 부위의 반이 결합되는 시간($t_{1/2}$)은 약 4min이며 ouabain 결합의 observed first-order rate constant (K_{obs})는 $0.12 \pm 0.0027 \text{ min}^{-1}$ ($n=4$)이었다.

Fig. 3-A는 $[^3\text{H}]$ ouabain 농도 증가에 따른 결합의 증가를 도시한 것이며, Fig. 3-B는 Fig. 3-A의 성적을 Scatchard plot에 의하여 나타낸 것이다. 본 실험에 사용한 ouabain의 최대 농도는 200nM로서 이 농도범위내에서 각점은 직선상에 놓여 있었고, 여기서 계산된 해리상수(K_D)와 결합부위농도(B_{max})는 각각 $111.3 \pm 18.6 \text{ nM}$ ($n=5$) 및 $1.2 \pm 0.2 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=5$)이었다.

Na^+, K^+ -ATPase의 ouabain 결합部位(ouabain binding site)의 수와 pump site(phosphorylation site)의 수와의 상관관계를 알아 보기 위하여 心室筋細胞를 SDS로 처리한 후 $[^{32}\text{P}]$ ATP를 사용하여 Na^+ -의존성 인산화(Na^+ -dependent phosphorylation 또는 acylphosphorylation)를 측정하였던 바 $40 \pm 5.7 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=5$)으로 $[^3\text{H}]$ ouabain 결합 실험에서 구해진 B_{max} 의 약 30배에 달하였다.

Cell count와 단백질량을 기준으로 계산했을때 1mg의 단백질은 1.754×10^5 개의 세포에 해당되었으므로 세포당 4.12×10^6 molecules의 ouabain이 high affinity site에 결합된다고 볼 수 있으며, 한개의 pump site가 한 분자의 ouabain과 결합한다고 가정할 때 rat 心室筋細胞 1개당 high affinity ouabain binding site 내지 pump site는 4.12×10^6 개가 되고 인산화실험으로 계산된 total site는 心筋細胞 1개당 1.37×10^8 개임을 추정할 수 있다.

心室筋細胞의 Ca^{2+} -Uptake—1mM MgCl_2 를 함유하는 Lock용액중에 분리한 心室筋細胞를 가지고 시간 경과에 따른 Ca^{2+} -uptake를 Fig. 4에 도시하였다. 心筋細胞의 Ca^{2+} -uptake는 처음 2분 동안 일정하게 증가되다가 2분 후 부터는 시간경과에 따라 점차 증가의 정도가 감소되어 15분에 최고($12.1 \pm 1.15 \text{ nmol}/10^5 \text{ cells}$, $n=3$)에 달하였으며 15분후 부터는 약간 감소되는 경향을 보였다. Myocyte를 10^{-5}M ouabain과 30분동안 접촉시킨후 Ca^{2+} -uptake의 time course를 관찰하였을 때는 myocyte의 Ca^{2+} -uptake가 대조군에 비하여 현저히 증가되었다(Fig. 4).

Fig. 5.에서는 ouabain 농도에 따른 myocyte의 Ca^{2+} -uptake 변화를 나타내었다. Ouabain 10^{-8}M

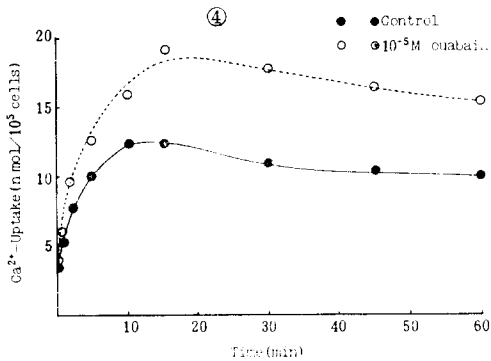


Fig. 4- Time course of Ca^{2+} -uptake by myocytes isolated from rat heart. Myocytes were incubated in the presence of 140mM NaCl, 3.4mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1.25mM CaCl_2 , and 5.5mM glucose with or without ouabain (10^{-5}M) at 37°C . Aliquots were filtered at various times and the filters were quickly rinsed 4 times with 5ml of washing solution containing 200mM KCl, 5mM MOPS/Tris(pH7.4), and 0.1mM EGTA. ●—●: Control, ○—○: in the presence of 10^{-5}M ouabain.

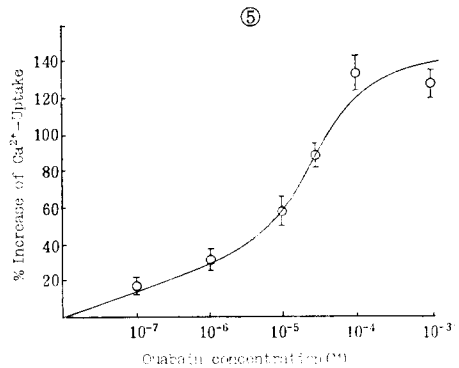


Fig. 5- Percent of increase in Ca^{2+} -uptake of rat cardiac myocytes as a function of ouabain concentration. Myocytes preincubated with ouabain at 37°C for 30 min were incubated in the same medium as described in Fig. 4 at 37°C for 15 min. Ca^{2+} -uptake without ouabain (control) was $11.6 \pm 0.8 \text{ nmol}/10^5 \text{ cells}$ ($n=5$).

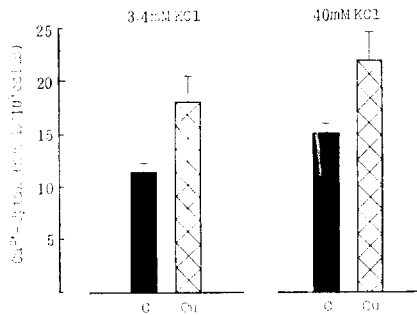


Fig. 6- Effect of ouabain on Ca^{2+} -uptake of rat cardiac myocytes in different K^+ concentration. Control and ouabain (10^{-5}M) treated myocytes were incubated in the presence of 140mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 1.25mM CaCl_2 , 5.5mM glucose, and 3.4mM or 40mM KCl at 37°C for 15 min. Legends are same as described in Method. Figure represents means \pm S.E. of values in five experiments.

처리로서는 Ca^{2+} -uptake에 영향을 미치지 못하였으나 10^{-7}M 에서는 약 18%의 유의적인 증가를 보였으며, ouabain 농도증가에 따라 그 증가의 정도가 증대되어 10^{-4}M 에서 약 130%의 최대 증가를 보였다. 여기서 Ca^{2+} -uptake 증가에 대한 ouabain의 ED_{50} 는 $21 \pm 4.8 \mu\text{M}$ ($n=5$) 이었다.

Fig. 6은 心室細胞의 Ca^{2+} -uptake 및 ouabain의 Ca^{2+} -uptake 증가에 미치는 K^+ 의 영향을 관찰한 것으로 K^+ 농도를 40mM로 증가시켰을 때 Ca^{2+} -uptake가 약 30% 증가되었음을 알 수 있다. 40mM의 K^+ 中에서 ouabain (10^{-5}M)의 Ca^{2+} -uptake 증가 효과는 정상 K^+ (3.4mM) 용액중에서의 효과와 유사하였다.

Table I에서는 calcium拮抗劑로 알려지고 있는 verapamil이 心室細胞의 Ca^{2+} -uptake에 미치는 영향과 ouabain의 효과에 미치는 verapamil의 영향을 요약하였다. 心室細胞의 Ca^{2+} -

uptake는 verapamil 10^{-5}M 및 10^{-4}M 처리에 의하여 약 20%, 45%가 감소되었으며 ouabain 10^{-7}M 과 10^{-5}M 에 의하여 각각 약 20% 및 50%가 증가되었다. 心室細胞를 10^{-4}M verapamil과 20분

Table I-Effect of verapamil on Ca^{2+} -uptake of rat cardiac myocytes.

	Ca^{2+} -uptake (nmol/ 10^5 cells)
Control	11.6 ± 0.8
Verapamil $10^{-5}M$	9.3 ± 0.9
$10^{-4}M$	6.4 ± 0.7
Ouabain $10^{-7}M$	14.0 ± 0.6
$10^{-5}M$	17.3 ± 1.5
Verapamil $10^{-4}M$	
+ouabain $10^{-7}M$	9.1 ± 0.9*
$10^{-5}M$	12.5 ± 1.1**

Myocytes were treated with verapamil for 20 min and with ouabain for 30 min. Ca^{2+} -uptake was initiated by the addition of myocytes treated with verapamil and ouabain into the same medium containing $^{45}CaCl_2$ as described in Fig. 4 and myocytes were incubated for 15 min at 37°C. Other legends are same as described in Method. Values are mean±S.E. of five different preparations. Significantly different from corresponding value of myocytes treated with $10^{-4}M$ verapamil (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

동안 반응시킨후 $10^{-7}M$ 및 $10^{-5}M$ ouabain의 효과를 관찰하였던 바 verapamil을 처리하지 않은 대조군에서의 ouabain효과와 유사하였다. 즉 verapamil은 ouabain의 Ca^{2+} -uptake증가에 하등의 영향을 미치지 못하였다.

考 察

Rat心室 sarcolemma에는 ouabain에 대한 K_D 가 각각 $0.1 \sim 0.2 \mu M$ 과 $28 \mu M$ 인 두 종류의 결합部位 즉 high affinity/low capacity site와 low affinity/high capacity site가 있으나 ouabain에 의한 rat心臟收縮力增加의 ED_{50} 는 $0.3 \mu M$ 로서 low affinity site에 대한 K_D 値와 sarcolemma의 Na^+, K^+ -ATPase 活性 억제로부터 계산된 I_{50} 치($40 \mu M$)와는 현저한 차이가 있음이 보고되어 있다.¹²⁾ Ouabain에 의한 rat心臟 Na^+, K^+ -ATPase의 억제는 고농도($1 \mu M$ 이상)에서만 관찰 되어지므로 만약 ouabain에 의한 心臟收縮力 증가의 ED_{50} 가 $0.3 \mu M$ 이라면 ouabain의 心臟收縮力 증가작용과 Na^+, K^+ -ATPase억제와는 서로 다른 機轉일 가능성이 있음을 시사하는 것으로서 이는 Na^+, K^+ -ATPase가 digitalis의 약리학적 receptor일 것이라는 가설에 중대한 문제점이 되지 않을수 없다. 그러나 Erdmann等¹²⁾이 사용한 ouabain의 최대 농도는 $30 \mu M$ 이었고 이 범위내에서 ED_{50} 를 산출 하였으므로 만약 ouabain이 $30 \mu M$ 이상의 농도에서 독작용을 일으키지 않고 心臟收縮力을 증가시킬 수 있다면 이들이 계산한 ED_{50} 는 정확한 값으로 看做될 수 없을 것이다. 따라서 저자등¹⁶⁾은 rat心室筋에서 $10^{-9} \sim 1.6 \times 10^{-4}M$ 의 ouabain을 사용하여 心臟收縮力 증가작용을 검토하였던 바 rat心室筋은 ouabain에 대하여 두가지 양상의 반응을 보였으며 low-dose response와 high-dose response의 ED_{50} 는 각각 약 $0.5 \mu M$ 및 $19 \mu M$ 로서, Erdmann等¹²⁾이 구한 ED_{50} 는 low-dose response에 대한 ED_{50} 였음을 알 수 있었다. 이 실험에서 high-dose response의 ED_{50} 치는 心室로부터 분리한 sarcolemma의 Na^+, K^+ -ATPase 抑制를 나타내는 I_{50} 치($50 \mu M$)와 유사한 값을 보여 high-dose response와 Na^+, K^+ -ATPase의 抑制와는 밀접한 상관관계가 있음을 시사하였다. 본 실험에서도 myocyte의 Ca^{2+} -uptake를 증가시키는 ouabain의 ED_{50} 는 약 $21 \mu M$ 로서 high-dose response의 ED_{50} 와 Na^+, K^+ -ATPase 抑制에 대한 I_{50} 치에 매우 가까웠으며 이는 ouabain이 心室細胞膜의 Na^+, K^+ -

ATPase를 억제하여 2次的으로 Ca^{2+} -uptake를 증가시켰음을 추측할 수 있다.

한편 low dose response의 ED_{50} 치가 sarcolemma의 $[\text{}^3\text{H}]$ ouabain 결합 실험으로 구한 high affinity site의 K_D 치와 일치하지만 실제로 rat 心臓에 ouabain에 대한 high affinity site가 존재하는지 즉 이 high affinity site가 心室로부터 분리한 sarcolemma에 心室中에 있던 fibroblast나 交感神經 節後纖維의 sarcolemma가 혼입되어 이들의 ouabain에 對한 affinity가 다름으로서 생긴 것인지, 또는 心室로부터 sarcolemma를 제조하는 과정에서 Na^+, K^+ -ATPase에 어떤 구조적 변화가 초래되어 인위적으로 창조된 것인지에 관해서는 아직 불명하며 high affinity site와 low-dose response와의 관계에 관해서도 현재까지 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 본 실험 결과 정상 세포에 가까운 rat 心室 細胞에서도 ouabain에 대한 K_D 가 약 110nM인 high affinity $[\text{}^3\text{H}]$ ouabain 結合部位를 탐지할 수 있었음은 rat 心臓에 실제로 ouabain에 대한 high affinity site가 존재함을 의미하는 것이라고 하겠다.

心筋의 形質膜을 통한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환에 관해서는 Reeves와 Sutko²⁰⁾가 직접 그 추구방법을 발표한 이래 많은 논문들²¹⁻²⁵⁾이 보고되어 있으며 세포막을 통한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환은 Na^+ 이동에 병행하여 일어나는 Ca^{2+} 이동의 한 과정으로서 세포내 Na^{2+} 농도 증가는 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환에 의해 세포내로 Ca^{2+} 섭취를 증가시킴으로 이 交換機轉은 心臓收縮과 心筋細胞內的 ion조절에 중요한 역할을 하고 있다. Digitalis의 心筋收縮力 증가작용은 digitalis가 Na^+, K^+ -ATPase를 억제하여 세포내 Na^+ 농도를 증가시키고 이는 세포막을 통한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환을 촉진시킴으로서 2차적으로 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 초래하기 때문이라고 설명되고 있다.^{10, 26, 27)} 그러나 전술한 바와 같이 ouabain의 high affinity site에 대한 K_D 치와 low-dose response의 ED_{50} 치가 Na^+, K^+ -ATPase의 억제로 구해진 I_{50} 치와 큰 차이가 있고, low-dose response를 나타내는 ouabain의 농도로서는 유의의한 Na^+, K^+ -ATPase의 억제를 일으키지 않는다는 보고^{12, 16)}로 볼때 high affinity site에 대한 ouabain 결합이 Na^+, K^+ -ATPase를 억제하지 않고 sarcolemma의 calcium pool을 증가시키는 것^{11, 28)}과 같은 機轉으로 心臓收縮力の 증가를 일으킬 가능성도 생각할 수 있다. 그러나 만약 저농도 ouabain에 의한 Na^+, K^+ -ATPase억제가 전체 酵素活性에 비해 아주 적은 값이어서 측정오차의 범위를 벗어나지 못했다면 그 결과의 해석은 전혀 달라질 것이다. 실제로 rat 心臓에서 ouabain의 high affinity site는 전체 ouabain 結合部位의 3~10%에 불과하다는 보고^{12, 29)}와 본 실험에서 rat心筋細胞를 0.025w/v% sodium dodecylsulfate로 처리한 후 $[\text{}^3\text{P}]\text{ATP}$ 를 가하여 측정된 phosphorylation site가 $[\text{}^3\text{H}]$ ouabain 結合部位의 3%에 불과했다는 점으로 미루어 보아 high affinity site를 Na^+, K^+ -ATPase 活性抑制의 방법으로 찾기는 매우 어려울 것으로 생각된다. 반면에 ouabain 및 digoxin의 心臓收縮力 증가작용은 그 receptor의 30~50%가 점령되면 최대에 달하므로³⁰⁾ 3~10%의 receptor 점령에 의한 low-dose response는 쉽게 관찰되어 질수 있을 것으로 추측된다. 따라서 low-dose response와 Na^+, K^+ -ATPase와의 관계에 대한 지견은 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환을 관찰하거나 세포내 Na^+ activity를 직접 측정하므로써 얻어 질수 있을 것이라 사료된다.

본 실험 결과 ouabain 100nM 이상의 농도에서 rat 心室筋 細胞의 Ca^{2+} -uptake가 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 일반적으로 세포내로의 calcium유입의 주 경로는 膜의 탈분극에 의하여 활성화되는 potential-dependent channel과 膜의 receptor와 관계되는 receptor-operated channel 및 형질막을 통한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환에 의한 유입을 들 수 있다. 본 실험에서 ouabain에 의한 心室細胞의 Ca^{2+} -uptake의 증가가 K^+ 농도증가나 Calcium 拮抗劑인 verapamil에 영향을 받지 않음을 볼때 ouabain의 Ca^{2+} -uptake 증가작용은 膜을 통한 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환의 촉진에 기인되었을 것으로 추리되

며 이는 low affinity site 뿐만아니라 high affinity site에 대한 ouabain 결합도 Na^+, K^+ -ATPase를 억제함을 암시하는 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과는 rat 心室筋에서 $100\mu\text{M}$ 이상의 ouabain은 농도에 비례하는 수축력의 증가와 세포내 Na^+ 활성을 증가시킨다는 저자들의 미발표 논문³¹⁾으로 더욱 뒷받침 된다.

結 論

Rat 心臟에서 ouabain에 대한 high affinity site의 존재와 그 기능을 알아 보기위하여 心室細胞를 분리하여 [^3H] ouabain 결합과 心室細胞의 Ca^{2+} -섭취에 미치는 ouabain의 영향을 검토하였다.

1) 心室細胞의 약 65%는 막대형의 beating cell이었다.

2) 心室細胞에 대한 ouabain의 해리상수(K_D)와 결합부위 농도(B_{max})는 각각 $111.3 \pm 18.6 \text{ nM}$ 및 $1.2 \pm 0.2 \text{ pmol/mg protein}$ 이었으며, sodium dodecylsulfate 처리후 측정된 Na^+ - 의존성 인산화(Na^+ -dependent phosphorylation)치는 약 $40 \text{ pmol/mg protein}$ 이었다.

3) 心室細胞의 Ca^{2+} -섭취는 ouabain 10^{-7}M 이상에서 농도증가에 비례하여 증가되었으며 ouabain 10^{-4}M 에서 최대에 달하였다.

4) Ouabain에 의한 心室細胞의 Ca^{2+} 섭취 증가는 탈분극 및 verapamil 처리에 영향을 받지 않았다.

5) 이상 결과 rat 心室細胞에 ouabain에 대한 high affinity site가 있고 이 site에 대한 ouabain의 결합도 Na^+, K^+ -ATPase를 억제하여 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 증가시킬 것으로 사료된다.

본 연구는 1983년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

文 獻

1. G.A. Langer, Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem, Pharmacol.* 30, 3261 (1981).
2. H. Matsui and A. Schwartz, Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the Na^+, K^+ -dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochim Biophys. Acta* 151, 655 (1968).
3. T. Akera, F.S. Larsen and T.M. Brody, Correlation of cardiac sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase activities with ouabain induced inotropic stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 173, 145 (1970).
4. A. Gelbart and R. Goldman, Correlation between microsomal Na^+, K^+ -ATPase activity and [^3H] ouabain binding to heart tissue homogenates, *Science*, 200, 1287 (1978).
5. L.H. Michael, B.J.R. Pitts and A. Schwartz, Is pump stimulation associated with positive inotropy of the heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 481, 689 (1977).
6. L.H. Michael, A. Schwartz and E.T. Wallick, Nature of the transport adenosine triphosphatase-digitalis complex. XIV. Inotropy and cardiac glycoside interaction with Na^+, K^+ -ATPase of isolated cat papillary muscles. *Mol. Pharmacol.* 16, 135(1979).
7. A. Schwartz, K. Whitmer, G. Grupp, I. Grupp, R.J. Adams and S.W. Lee, Mechanism of action of digitalis; Is the Na, K -ATPase the pharmacological receptor? *Ann N.Y. Acad. Sci.* 402, 253 (1982).
8. J.H. Dahl and L.E. Hokin, The sodium-potassium adenosine triphosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 237(1974).
9. A. Schwart, G.E. Lindenmayer and J.C. Allen, The sodium-potassium adenosine triphosphatase, Pharmacological physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27, 3 (1975).
10. T. Akera and T.M. Brody, The role of the Na^+, K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29, 187 (1977).

11. N.V. Wellsmith and G.E. Lindenmayer, Two receptor from for ouabain in sarcolemma-enriched preparations from canine ventricle. *Circ. Res.* **47**, 710 (180).
12. E. Erdmann, G. Philipp and H. Scholtz. Cardiac glycoside receptor, (Na⁺-K⁺)-ATPase activity and force of contraction in rat heart. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 3219 (1980).
13. V.K. Sharma, S.P. Banerjee. Specific [³H] ouabain binding to rat heart and skeletal muscle; Effect of thyroidectomy *Molec. Pharmacol.* **14**, 122 (1978).
14. U. Fricke and K. Klaus, Evidence for two different Na⁺-dependent [³H] ouabain binding sites of a Na⁺,K⁺-ATPase of guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* **61**, 423 (1977).
15. K.J. Sweadner, Two molecular forms of (Na⁺-K⁺)-stimulated ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* **254**, 6060 (1979).
16. R.J. Adams, A. Schwartz, G. Grupp, S.W. Lee, E.T. Wallick, T. Powell, V.W. Twist and P. Gathiram, High-affinity ouabain binding site and low-dose positive inotropic effect in rat myocardium. *Nature* **296**, 167 (1982).
17. T. Powell and V.W. Twist, A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 327 (1976).
18. O.H. Lowry, H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
19. E.T. Wallick and A. Schwartz, Thermodynamics of the rate of binding of ouabain to the sodium potassium-adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **249**, 5141(1974).
20. J.P. Reeves and J.L. Sutko, Sodium-calcium ion exchange in canine membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 590 (1979).
21. B.J.R. Pitts, Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemma vesicles. Coupling to the sodium pump. *J. Biol. Chem.* **254**, 6232 (1979).
22. P. Caroni, L. Reinlib and E. Carafoli, Charge movements during the Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart sarcolemmal vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 6354 (1980).
23. D.M. Bers, K.D. Philipson, A.Y. Nishimoto, Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 358 (1980).
24. W.R. Trumble, J.L. Sutko and J.P. Reeves, ATP-dependent calcium transport in cardiac sarcolemmal membrane vesicles. *Life Sci.* **27**, 207 (1980).
25. K.D. Philipson and A.Y. Nishimoto, Efflux of Ca²⁺ from cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* **256**, 3698 (1981).
26. G.A. Langer, Effect of digitalis on myocardial ionic exchange. *Circulation*, **46**, 180 (1972).
27. H. Reuter, Exchange of calcium in the mammalian myocardium. *Circ. Res.* **34**, 599 (1974).
28. A. Gervais, L.K. Lane, B.M. Anner, G.E. Lindenmayer and A. Schwartz, Ouabain action on calcium binding to sites associated with a purified sodium potassium-activated adenosine triphosphatase from kidney. *Circ. Res.* **40**, 8 (1977).
29. S.W. Lee, A. Schwartz, R.J. Adams, Y. Yamora, K. Whitmer, L.K. Lane and E.T. Wallick, Decrease in Na⁺-K⁺-ATPase activity and [³H] ouabain binding sites in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **5**, 682 (1983).
30. L.H. Michael, A. Schwartz and E.T. Wallick, Nature of transport adenosine triphosphatase-digitalis complex; XIV. Inotropy and cardiac glycoside interaction with Na⁺,K⁺-ATPase of isolated cat papillary muscles. *Molec. Pharmacol.* **16**, 135 (1979).
31. C.C. Lee, W.B. Im, M.S. Pecker, I. Grupp, S.W. Lee and A. Schwartz, Effect of ouabain on intracellular sodium ion activity and twitch tension of rat ventricular muscle. *Submitted to Circ. Res. Jan.* (1984).