大韓藥理學會雜誌：第14卷 第1·2號
Korean J. of Pharmacology
Volume 14, Number 1·2, 1978

Na^+ 및 K^+에 의한 심장근 Mitochondria에서의 Ca^{++}유리작용

서울대학교 의과대학 약리학교실

김 명 석

==Abstract==

The Calcium Release from Cardiac Mitochondria by Sodium and Potassium

Myung Suk Kim

Dept. of Pharmacology, College of Medicine Seoul National University

The Na^+-and K^+-induced Ca^{++} release was measured isotopically by Milipore filter technique in mitochondria isolated from rabbit ventricles.

The release of Ca^{++} from mitochondria could be induced by 1—3 mM of Na^+ added in incubating medium under the presence of 0.5mM EGTA to prevent the released Ca^{++} from rebinding with mitochondrial membrane. The amount of Ca^{++} released was increased by increasing the concentration of Na^+ added.

100mM K^+, in itself, did not induce the Ca^{++} release from cardiac mitochondria, the Na^+-induced Ca^{++} release, however, was potentiated by the presence of K^+. The potentiation of Na^+-induced Ca^{++} release by K^+ was proportional to the Na^+/K^+ ratio presented in the incubating medium.

Among the monovalent cations other than Na^+, the release of Ca^{++} from cardiac mitochondria was shared only by Li^+.

The Na^+-induced Ca^{++} release could be also observed in the mitochondria isolated from liver and kidney. However, the Na^+ sensitivity was somewhat lower in liver and kidney mitochondria than in heart mitochondria. The release of Ca^{++} induced by Na^+ in the mitochondria isolated from the experimentally produced failured heart was not different from that in the normal heart mitochondria, and was not directly modified by $10^{-6}\sim10^{-5}$ M of Ouabain.

From the experiments, it was suggested that the Ca^{++} released from mitochondria by Na^+ could be used in excitation-contraction coupling process to initiate the contraction of the cardiac myofibrils.

Futhermore, it appeared that the phenomenon of Ca^{++} release from cardiac mitochondria by Na^+ and K^+ might be related to the inotropic effect of digitalis glycoside which could bring about the increase of Na^+ or the reduction of K^+ intracellulary through the inhibition of Na^+, K^+-ATPase.

서 론

심장근 수축에 있어서 calcium이 중심적인 역할을 한다는 사실을 Sidney Ringer (1883)의 실험에서부터 비롯되었다. 개구리 심장을 현수한 영양액 내의 Ca^{++} 농도를 증가시킴에따라 심근수축력이 점차로 증가하였으나, 반대로 Ca^{++} 농도를 낮출 경우 심근수축력이 감소하여 Ca^{++}이 완전히 없을 때는 심근 수축도 정지된다고 보고하였다.

그 이후 근세포내 Ca^{++} 이온은 심장근이나, 골격근이거나 간에 심수축시 세포막의 전기적 흥분현상과 근섬유의 수축을 연결시키는 과정(excitation-contraction coupling, E-C coupling)에서 절대적인 중심 역할을 한다는 사실이 잘 알려져왔다.

E-C coupling의 현재 인정되는 개념은 1)근세포막 전위의 탈분극에 의하여 발생된 세포막을 통한 활동전압이 T-system을 통하여 내부로 전파되는 것과 더불어 2)세포내의 유리 Ca^{++}이온농도가 증가되며 3) 그 Ca^{++}은 근 수축기구의 조절단백인 troponin-tropomyosin system 중 troponin과 결합하여 조절단백체의 기능적인 변형을 초래하므로서 수축 단백인 actin-myosin system의 상호작용에대한 troponin-tropomyosin의 방해 작용을 제거하게 되어 근섬유의 수축이 일어나는 것으로 받아 들여지고 있다(Fozzard. 1977).

한편 심부전증에 있어서 심근 수축력이 감소하는 기전은 아직 명확히 규명되지 못하고 있으나 E-C coupling 과정에 이상이 있어서 수축력이 감소될 것으로 인정되고 있으며 이러한 부전심근에서 수축력을 증가시키는 digitalis 강심배당체도 역시 기전은 분명치 않으나 심근세포의 exchangeble free Ca^{++} 농도를 증가시킴으로서 E-C coupling 과정을 촉진시킬 것으로 추정되고 있다(Lee and Klaus, 1971).

그러나 이와같이 정상 심근수축에서 뿐만아니라 심부전증에서의 수축력감소기전 그리고 digitalis 배당체의 강심작용기전에 있어서 촛점이되고 있는 E-C coupling 과정중 아직도 분명치 못한 점은 세포막의 전기적 흥분현상과 관련하여 둘째 단계에서 근세포내에 증가하는 Ca^{++}이온이 어떠한 기전으로 어디에서 유래하는 것인가 하는 점이다.

근세포의 Ca^{++}이온을 조절할 수 있는 세포내 기구로서 골격근의 경우에는 sarcoplasmic reticulum의 역할이 거의 전적으로 인정되고 있다(Ebashi and Lipmann, 1962:Ebashi, 1976: Fuchs, 1974: Hasselbach and Makinose, 1963). 그러나 심장근에 있어서는 아직도 이론의 여지가 많은 바 sarcoplasmic reticulum 외에도 mitochondria가 또한 심근세포내 Ca^{++}이온 농도 조절기구로서 직접적으로 중요한 역활을 할 것이라는 보고들이 있어왔다(Affolter et. al., 1976: Carafoli 1975: Lehninger, 1970: Patriaca and Carafoi, 1968). 즉 심근세포에는 골격근세포에 비하여 sarcoplasmic reticulum의 존재가 극히 적을 뿐아니라 조직적으로 배열되어 있지도 않으며(Fawcett and McNutt, 1968: Page and McCallister, 1973), Ca^{++} 운반능력에 있어서도 골격근의 그것에 비하여 보다 약한 반면에(Chimoskey and Gergley, 1968: Ebashi and Endo, 1968: Fanburg et. al., 1963) mitochondria는 심근세포에 풍부히 존재하고(Fawcett and McNutt, 1968: Laguens, 1971), Ca^{++}과의 친화성, Ca^{++}의 저장능력 및 결합속도로 볼 때 심장근의 수축, 이완을 조절하고도 남을 수 있을 만큼 충분한 Ca^{++} 운반능력을 갖는다고 보고하고 있다(Affolter et. al., 1976: Carafoli, 1974 1975: Chance, 1965: Lehninger et al., 1967)

그러나 심근세포에서 mitochondria의 Ca^{++} 조절역할 가운데 현재 분명치 못한 점의 하나는 심근수축의 E-C coupling 과정에서 세포막흥분과 결부하여 이용가능한 Ca^{++}이 mitochondria에서부터 직접 유리될 수 있는가 하는 점이다. 몇몇 연구자에 의하면 *mitochondria*의 oxidative phosphorylation uncoupler, respiratory inhibitor, 그리고 Ca^{++}-specific ionophore A_{23187} 또는 ruthenium red 등이 mitochondria에서부터 Ca^{++} 유리를 유도한다고 보고하고 있으나(Drahota et. al., 1965: Reed and Lardy, 1972: Rossi et al. 1973: Sordahl, 1974) 이것은 mitochondria의 Ca^{++}이 여러 사람들의 주장과 같이 유리될 수 없는 비가역적인 상태로만 존재하는 것이 아니고 유리될 수 있는 유동적인 상태로 존재하는 부분도 있다는 것을 말해주는 증거이기는 하나 실제로 이러한 물질들이 정상적으로 세포에 존재하는 것들이 아니기 때문에 이같은 현상의 생리학적인 의미에 대해서는 무어라 말할 수 없었다.

따라서 본실험에서는 세포내에 존재하는 정상이온으로 세포막의 전기적 흥분 현상과 직결되어 변화하는 Na^+및 K^+에 의한 심근 mitochondria에서의 Ca^{++}유리 작용을 관찰하고 이의 생리학적 의의 및 digitalis 배당체의 강심작용 기전과의 관련성에 대하여 고찰해 보고자 한다.

실 험 방 법

1) Mitochondria 추출

실험동물은 체중 2.5~3kg의 웅성 가토를 사용하였으며 Sulakhe and Dhalla(1971)의 방법에 준하여 심실

근에서 추출하였다.

가토의 두부에 타격을 가하여 급사시킨 후 즉시 심장을 적출하여 심실을 분리해서 냉 homogenising 용액(0.25M Sucrose, 5mM Tris-HCl, pH7.4, 1mM EDTA)에 넣고 잘게 썰었다. 썰은 조직을 10배 용량의 동일 homogenising 용액에서 Polytron 조직분쇄기(Brinkman, Model PT20)로 5초 동안 homogenation한 후 1,000g에서 20분동안 냉동원심분리하여 심근섬유조직편, 핵, 결체조직등을 제거하고 상등액만 분리하여 4겹의 cheese cloth를 통하여 여과하였다. 여액을 10,000g에서 20분 동안 냉동원심분리하여 얻어진 mitochondria 잔사를 4배 용량의 동일 homogenising 용액에 부유시켜 10,000g 15분동안 다시 냉동원심분리하여 세척하였으며 이러한 세척은 2회 반복하였고 최종세척용액에서는 EDTA를 삭제하였다. 얻어진 mitochondria는 0.25M Sucrose, 5mM Tris-HCl, pH7.4용액에 단백질농도로 4~5mg/m*l* 되게 부유시켜 실험에 공여하였다. 상기조작은 전부 0~4°C에서 행하였으며 단백농도는 folin-phenol 시약을 사용하여 Lowry(1951)의 방법으로 측정하였다.

2) Mitochondria의 Ca^{++} 흡수 및 유리

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

25°C진탕수욕조에서 4ml의 흡수 반응액(0.25M Sucrose 또는 100mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4 10mM Tris-succinate, 8×10^{-6} M $CaCl_2+Ca^{45}$)이 들어 있는 작은 용기에 mitochondria를 1mg/m*l* 되게 첨가하므로서 흡수반응을 시작시켰다.

Ca^{++}흡수가 최대로 일정한 수준에 도달했을 때 mitochondria를 함유한 상기 흡수 반응액 1m*l*를 실험결과에서 지시하는 각종 농도의 Na^+ 또는 기타 이온이 함유된 동일 용량의 유리반응액(0.25M Sucrose 또는 100mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM Tris-succinate, 0.5mM EGTA)과 혼합하여 동일조건의 진탕수욕조상에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 이혼합반응액 0.4m*l*를 Milipore filter(HAWP 13mm, Pore size 0.45micron)에 옮긴 후 즉시 음압하에서 여과하였다. 여액 0.1m*l*를 10m*l*의 liquid scintillation cocktail, Aquasol®(New England Nuclear)이 들어있는 병에 첨가한후 liquid scintillation spectrometer (Packard, Tri-Carb-Model 3375)로 방사능을 측정하여 유리된 Ca^{++}양을 계산하였다.

Digitalis 강심배당체를 사용하는 실험에서는 mitochondria를 Ca^{++}과 호흡기질이 들어있지않은 완충용액에서 ouabain 10^{-6}~10^{-5}M로 30분동안 먼저 전처치한 후 Ca^{++}과 Tris-succinate를 첨가하므로서 흡수반응을 시작시켰다.

3) 실험적 심부전증

정상심장세포와 부전심장세포에 있어서 mitochondria의 Ca^{++}유리작용을 비교하기 위하여 수술방법으로 실험적 심부전증을 유발시켰다. 수술방법은 흡습성인 Ameroid (American plastic corp. Bainbridge, N.Y., U.S.A)를 사용한 Sordahl (1970)등의 방법에 준하였다. 체중 2.5~3kg의 건강한 웅성가토를 30mg/kg, Pentobarbital Na으로 마취하고 인공호흡하에서 정중선으로 흉부를 절개한 후 심낭을 분리하고 상행대동맥에 stainless steel로 겉을 싸고 중앙에 구경 4mm의 구멍이 뚫린 직경 1cm의 원반상 Ameroid clip을 삽입하므로서 시간 경과에 따라 점차적인 대동맥협착이 일어나도록 하였다. 수술 2주 후에 체중 대 장기무게의 비를 정상동물의 그것과 비교한 후(Table) 심실근에서 mitochondria를 추출하여 실험에 사용하였다.

	Organ Wt./Body Wt. Ratios$\times10^{-3}$	
	Normal	Operated*
Heart	1.80±0.04	3.01±0.19
Lung	4.92±0.52	7.14±0.99
Liver	29.53±0.88	27.38±1.36

※ Operated animals were sacrificed at 2 weeks after surgery.

실 험 결 과

1) Na^+에 의한 Ca^{++}유리

정상 심근세포의 Ca^{++}이온농도에 가까운 microM범위의 아주 낮은 Ca^{++} 존재하에서는 energy를 사용한 mitochondria막의 Ca^{++} 결합능이 대단히 활발하였고 본 실험조건에서 반응 3분이내에, 첨가한 Ca^{++}($8\mu M$)의 90~95%가 결합되어 상당시간 일정수준을 유지하였다. Ca^{++}결합이 최대로 일정한 수준에 이르렀을 때 반응액에 1~3mM의 소량의 Na^+을 첨가할 경우 mitochondria에서 부터 결합되었던 Ca^{++}의 급격한 유리가 일어났다. Fig. 1에서와 같이 mitochondria의 Ca^{++} 결합이 일정수준에 달한 흡수반응 3분에 2mM의 Na^+ 첨가에의해서 결합되었던 총 Ca^{++}양의 15%가 30초에, 1분에는 28%정도 유리되었으며 시간 경과에 따라 현

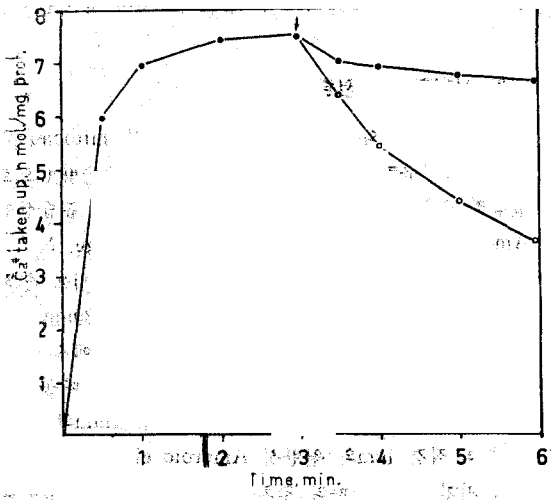

Fig. 1. Effect of NaCl on the Release of Ca^{++} from Cardiac Mitochondria. Mitochondria isolated from rabbit ventricles were preloaded with Ca^{++} by incubating in a medium containing 0.25M Sucrose, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM Tris-succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1mg/ml of mitochondrial protein. After 3 minutes incubation Ca^{++} release was induced by the addition of 2mM NaCl (○) or an equal concentration of Ca^{++}-free buffer solution (●) in the presence of 0.5mM EGTA.

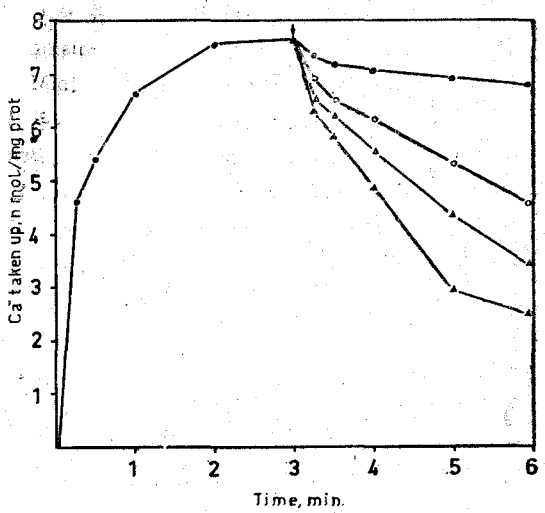

Fig. 2. Increased Ca^{++} Release from Mitochondria with Increasing Concentration of NaCl. Mitochondria were incubated in an uptake medium consisted of 0.25M Sucrose, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1mg/ml of mitochondrial protein. At 3 minutes after incubation 1mM NaCl (○) 2mM NaCl (▲), 3mM NaCl (△) or an identical concentration of buffer (●) was added in the presence of 0.5mM EGTA.

저한 유리의 증가를 보였다. 이와같은 Na^+에 의한 Ca^{++}유리현상은 반응액에 첨가되는 Na^+양의 증가에 비례하여 증가하였다(Fig. 2). 한편 본 실험조건에서는 유리되는 Ca^{++}만을 특별히 추적하기 위하여 일단 유리된 Ca^{++}은 재결합이 일어날 수 없도록 유리반응액에 Ca^{++} chelator인 EGTA를 0.5mM 첨가하였으며, 이때 EGTA자체에 의한 Ca^{++}유리양은 총결합 Ca^{++}양의 10%이내에 불과하였다.

2) Na^+의 Ca^{++}유리작용에 대한 K^+의 영향

근세포내 일가양이온중 대종을 이루는 K^+이온이 mitochondria의 Ca^{++}유리작용에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 3에서와 같이 K^+100mM 단독에 의한 mitochondria로부터의 Ca^{++}유리작용은 전혀 현저치 못하였다. 그러나 Na^+의 존재에 의하여 일어나는 Ca^{++} 유리작용에 대하여는 K^+이 상승적으로 증가시켰으며 특히 반응액내의 Na^+/K^+ ratio로 볼때 그 비율이 클수록 Ca^+유리작용이 현저히 증가하였고, 또 같은 Na^+/K^+ ratio에서라면 Na^+농도에 비례해서 Ca^{++}유리의 크기가 좌우되었다(Fig. 3A and B).

한편 이와같은 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리에 대하여 K^+이 상승적으로 작용하는 현상이 두이온간에만 보이는 상호작용인지의 여부를 검토하기 위하여 K^+을 choline으로 대치하였으나(Fig. 4) 이경우에는 choline단독에서 뿐아니라 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리에 대하여도 거의 영향을 미치지 않았다. 따라서 이러한 Na^+의 Ca^{++}유리작용에 대한 K^+의 상승효과는 두이온사이에만 비교적 특수하게 보이는 상호작용으로 간주하였다.

3) Li^+에 의한 Ca^{++}유리작용

Mitochondria에서 부터의 Ca^{++}유리가 일반적으로 일가양이온들에서 보이는 속성인지 또는 Na^+이온만이 갖는 특성인지 여부를 규명하기 위하여 주기율표에서 Na^+과 같은 group에 속하는 일가양이온들에 대하여 검토하였으나 그중 ionic crystal radius, 물에서의 conductance 및 absolute mobility, 그리고 hydration number등 물리적 특성과 생리적 특성에 있어서 Na^+과 가장 유사한 Li^+에 의해서만 Fig. 5에서와 같은 Ca^{++}유리작용을 보였다. 그러나 Li^+에 의한 Ca^{++}유리작용은 Na^+에 비해 훨씬 미약하여 그 정도가 Na^+의 1/5에 불과했다. 따라서 mitochondria에서의 Ca^{++}유리현상은 비교적 Na^+만이 갖는 특성일 것으로 여겨졌다.

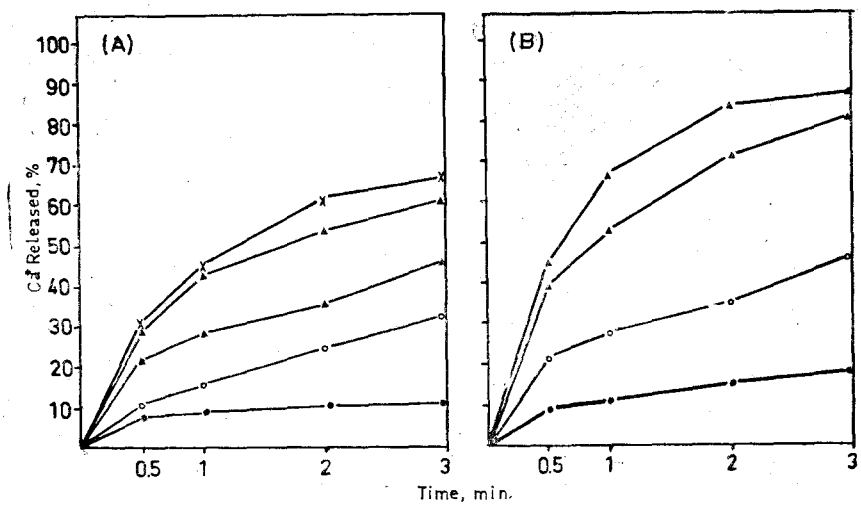

Fig. 3. Influence of KCl on the Na^+-induced Ca^{++} Release from Heart Mitochondria. After 3 minutes incubation of mitochondria in a medium of 0.25M Sucrose, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2+Ca^{45}$ and 1mg/m*l* of protein, Ca^{++} release was observed by the addition of the followings in the presence of 0.5mM EGTA as described in method section: (A) Ca^{++}-free buffer (●), 1mM NaCl (○), 1mM NaCl+100mM KCl (▲), 1mM NaCl+50mM KCl(△), 1mM NaCl+33 mM KCl(×),
(B) 100mM KCl (●), 1mM NaCl+100mM KCl (○), 2mM NaCl+100mM KCl (▲), 3mM NaCl+100mM KCl (△). The amount of Ca^{++} relased was expressed as a percentage of Ca^{++}loaded in mitochondria(ordinate) versus time (min.) after initiating release reaction (abscissa).

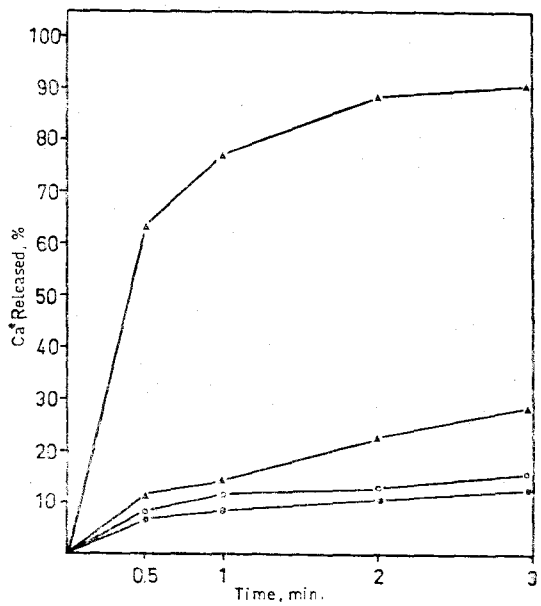

Fig. 4. Influence of Choline Chloride on the Na^+-induced Ca^{++} Release from Heart Mitochondria.

Mitochondria isolated from rabbit heart were incubated in a medium consisted of 100mM Choline Cl, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2+Ca^{45}$ and 1mg/m*l* of mitochondrial protein. At 3 minutes of incubation release of Ca^{++} was started by adding the followings in the presence of 0.5mM EGTA : 50mM KCl(○), 2mM NaCl (▲) 50mM KCl+2mM NaCl(△) and Ca^{++}-free medium (●).

4) 간 및 신장 mitochondria에서의 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리

위에서와 같은 Na^+에 의한 mitochondria 로 부터의 Ca^{++}유리현상이 심장 mitochondria에서만 볼 수 있는 특이한 현상인지 또는 다른 기관, 장기의 mitochondria 에서도 공통적으로 보이는 것인지를 검토하기 위하여 간과 신장에서 추출해 낸 mitochondria를 사용하여 똑같은 조건에서 실험하였던바 Fig. 6 및 Fig. 7에서와 같이 간 및 신장 mitochondria에서도 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리를 보이고 있으나 Na^+에 대한 감수성에 있어서는 심근 mitochondria에 비하여 훨씬 낮아서 각각 1/10, 1/5밖에 안되었다.

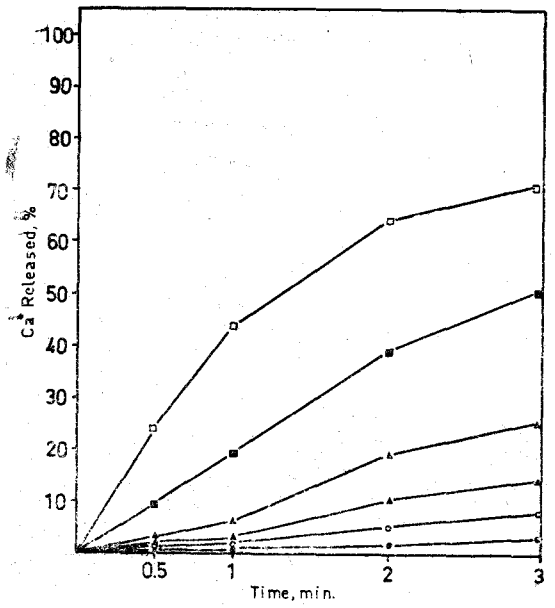

Fig. 5. Release of Ca^{++} from Cardiac Mitochondria by LiCl.

Mitochondria were incubated in a medium of 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10m M Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1 mg /m*l* of mitochondrial protein. At 3 minutes after incubation, Ca^{++} release was initated by the addition of following concentrations of LiCl in the presence of 0.5mM EGTA; 1mM(○), 2mM (▲), 3mM (△), 5mM (■), 10mM (□) and identical concentration of Ca^{++}-free buffer (●).

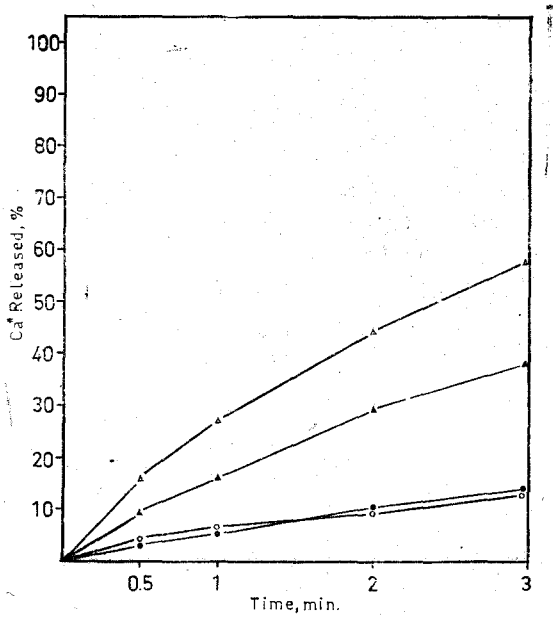

Fig. 6. Na^+-induced Ca^{++} Release from Liver Mitochondria. Mitochondria isolated from rabbit liver were incubated in a medium containing 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1mg/m*l* of mitochondrial protein. After 3 minutes of incubation Ca^{++} release was observed by the addition of 1mM NaCl (○), 5mM NaCl (▲) 10mM NaCl (△) and an equal concentration Ca^{++}-free buffer (●) in the presence of 0.5mM EGTA as described in method section.

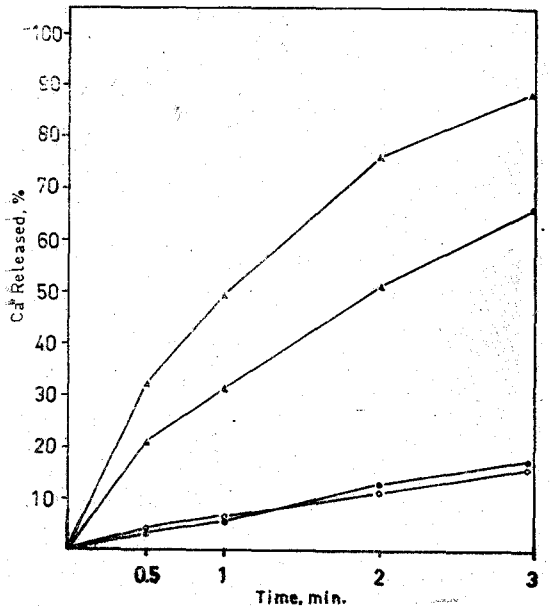

Fig. 7. Na-induced Ca^{++} Release from Kidney Mitochondria.

Mitochondria isolated from rabbit kidney were incubated in a medium of 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1mg/m*l* of mitochondrial protein. At 3 minutes after incubation Ca^{++}release was studied by adding 1mM NaCl (○), 5mM NaCl(▲), 10mM NaCl (△) and an identical concentration of Ca^{++}-free buffer solution(●) in the presence of 0.5mM EGTA.

5) 부전심근 mitochondria의 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리 및 Ouabain의 영향

부전심근세포에 있어서 mitochondria의 기능에 대하여는 한마디로 단언하기는 곤란하나. Ca^{++}운반능력에 관한한 부전증 발생의 단계에따라 대상성 부전상태에서는 정상과 변함이없으나 수축력이 심히 감소되어 있는 말기의 부전심근에서는 mitochondria의 Ca^{++}흡수양 및 속도가 상당히 저하된다고 보고되고 있으며(Harigaya, 1969; Schwartz et. al., 1973; Sordahl et. al., 1973) mitochondria와 Ca^{++}의 상호작용에 대한 digitalis 강심배당체의 영향에 대해서도 뚜렷한 결과를 못 보고 있다(Lee and Klaus, 1971).

본 실험결과에 의하면 흡습성인 Ameroid clip을 사용하여 점차적으로 대동맥 협착을 유도하므로서 실험적으로 발생시킨 부전심근의 mitochondria에서 Na^+에 의한 Ca^+유리작용은 정상심근 mitochondria에서

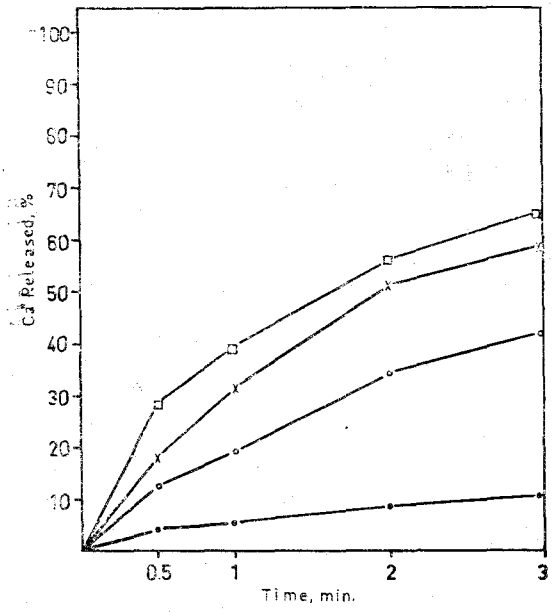

Fig. 8. Effect of NaCl on the Release of Ca^{++} from Failured Heart Mitochondria.
Mitochondria isolated from experimentally produced failure heart of rabbit were incubated in 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45} and 1mg/m*l* of protein. At 3 minutes of incubation the addition of 1mM NaCl(○), 2mM NaCl (×), 3mM NaCl (□) and an equal concentration of Ca^{++}-free buffer (●) were made.

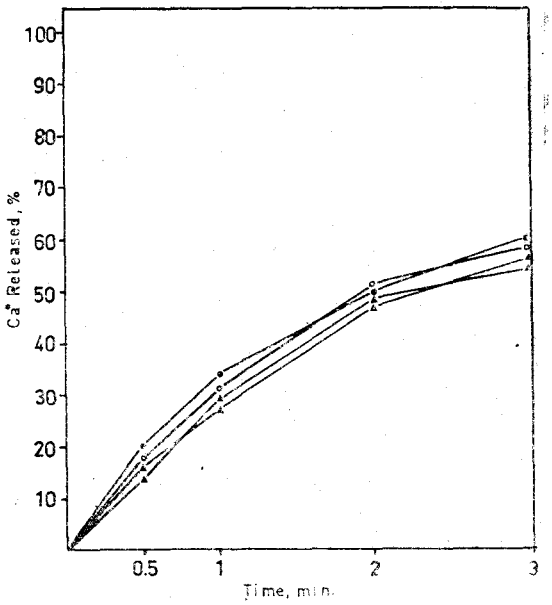

Fig. 9. Effect of Ouabain on the Na^+-induced Ca^{++} Release from Failured Heart Mitochondria. Mitochondria isolated from failured rabbit heart were incubated in a medium containing 100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Tris-Succinate, 8μM $CaCl_2$+Ca^{45}, 1mg/m*l* of protein. After 3 minutes of incubation the release of $Ca^{++}$was initiated by the addition of 2mM NaCl in the presence of 0.5mM EGTA. The mitochondria were pretreated with 10^{-6}M (▲), 10^{-5}M (△) or without(○) ouabain as described in method section. For comparison, Ca^{++} release from normal heart mitochondria not treated with ouabain (●) was presented.

와 같은 정도로 현저하였고 하등의 차이를 보이지 않았으며(Fig. 8) 유효강심농도를 지나치는 ouabain 10^{-6}~10^{-5}M에 의해서도 Ca^{++} 유리작용이 직접적으로는 영향을 받지 않았다(Fig. 9).

고 찰

심장근의 경우 Ca^{++}을 조절할 수 있는 세포내기구로서 mitochondria의 가능성을 인정한다면, 전술한 바와 같이 E-C coupling 과정중 세포막의 전기적흥분현상과 결부하여 심근수축에 이용될 수 있는 Ca^{++}이 mitochondria로부터 유리될 수 있을 것인가를 밝히는 것이 중요한 문제의 하나가 되겠으나 지금까지 이문제에 있어서는 심근세포의 미세구조상 mitochondria가 T-

system과 연결되어 있지 않기 때문에 세포막의 활동전압이 직접 mitochondria에 전달되어 Ca^{++}을 유리할 수 있는 가능성은 희박하다는 점에서 많은 연구자들의 관심의 대상 밖이었다. 그러나 만일에 세포막의 전기적 흥분현상이 이와 관련된 모종의 매개체에 의하여 간접적으로 전달될 수있다면 E-C coupling에 있어서 mitochondria의 역할을 배제할 수는 없을 것이다.

이러한 점에서 볼때 본실험에서와 같이 Na^+에 의하여 mitochondria로부터 Ca^{++} 유리가 일어나는 현상은 Na^+이 세포막의 탈분극시 발생하는 활동전압의 급속내향 전류로 세포내부에 유입된다는 사실로서 Na^+이 그 매개체가 될 수 있을 것이라는 생각에 흥미로운 결과라 여겨졌다.

즉 반응액에 첨가한 1~3mM의 소량 Na^+은 mitochondria에 결합되어 있던 Ca^{++}을 현저히 유지시켰으며, Na^+의 증가에 비례하여 Ca^{++}유리양도 증가하였다. 이러한 Ca^{++} 유리작용은 비교적 Na^+에 특이한 현상으로 다른 일가양이온중 Na^+을 대치할 수 있는 Li^+에 의해서만 어느 정도 보였으며, 다른 장기와 비교해 볼때도 심근 mitochondria에서 더욱 현저하였다.

그러나 이와같이 Na^+에 의하여 mitochondria에서 유리되는 Ca^{++}이 E-C coupling에 관여하는 Ca^{++}일 가능성은 있다 하더라도 과연 그 Ca^{++}이 실제로 in vivo에서 심장근의 매수축—이완주기에 관여하는 Ca^{++}일 수 있을 것이며, 또 매수축—이완에 관여하는 Ca^{++}의 전부가 mitochondria에서만 유리되는 Ca^{++}일 것인가 하는 의문에 대해서는 본실험결과만으로는 확언하기 곤란하다. 심근의 매수축—이완시에 심근섬유와 원형질 사이에 교환되는 Ca^{++}양을 약 25nmoles/g. tissue라 하고 (Carafoli, 1975), 심근의 mitochondria 함유량이 65~80mg/g. tissue (Laguens, 1971: Scarpa and Graziotti, 1973)라고 했을 때, 심근세포내의 Ca^{++}이 mitochondria에 의해서만 조절된다고 가정하면, 매수축시 mitochondria가 유리해야할 Ca^{++}양은 0.4n mole Ca^{++}/mg. mitochondria 이하 밖에는 안되므로 본실험에서와 같은 Ca^{++}유리정도라면 양적인 면에서는 심근의 매수축에 이용되는 Ca^{++}양이 될 수 있겠으나, 시간적인 관계에 있어서 Ca^{++}유리율이 매수축—이완주기에 맞을 수 있을 것인지, 또 매수축—이완시 세포막 흥분에 결부된 세포내로의 Na^+유입양이 Ca^{++}을 유리할 수 있는 충분한 양이 될 수 있을 것인지가 해결이 안되었기 때문이다. 또한 심근의 수축성은 골격근에서와는 달리 세포외 Ca^{++} 농도에 따라 크게 영향을 받는다는 사실로 볼 때 (Fleckenstein, 1964: Ringer 1883: Weidmann, 1958) 활동전압 고원기의 완만내향전류로서 외부로부터 들어오는 Ca^{++}(Reuter, 1973, 1974)을 고려하지 않으면 안되기때문에 mitochondria에서 Na^+에 의하여 유리되는 Ca^{++}만이 심근의 E-C coupling에 이용되는 Ca^{++}의 전부라고 단정하기도 현재로서는 곤란하다.

Digitalis 강심배당체가 심근수축력을 증가시키는 작용은 E-C coupling이 촉진된 결과일 것으로 인정되고 있으나, 어떠한 기전에 의하여 심근의 E-C coupling이 촉진될 것인가에 대하여는 아직 불명확한 점이 많다. 현재까지 연구 보고된 결과를 종합해 보면 유효강심작용을 나타내는 농도의 digitalis배당체는 E-C coupling에 관계되는 요소들 가운데 심근세포의 energy 대사, 세포막의 전기적현상, 그리고 근수축기구인 actin, myosin, troponin-tropomyosin system, 또는 심근의 기계적 성질등에 대하여는 별다른 영향을 직접적으로 미치지 않으나 근세포내 exchangeable free Ca^{++}농도만은 증가시킨다는 결론이다. 따라서 *digitalis* 배당체의 강심작용기전을 규명하는 데 있어서는 이러한 Ca^{++}이 증가되는 기전을 밝히는 것이 가장 중요한 점의 하나로 여겨지고 있다(Lee and Klaus, 1971).

한편 세포막을 통한 Na^+, K^+의 능동적 이동, 즉 세포내부에서 외부로 농도차를 역행하여 Na^+을 퍼내고 동시에 외부에서 내부로 K^+을 끌어들이는 소위 Na-pump의 활동은 Na^+, K^+-ATPase에 의하여 주관되며 (Skou, 1965), 이 ATPase의 활성은 digitalis 강심배당체에 의하여 특이하게 억제된다는 사실이 잘 알려져 있다(Albers, 1967; Besch et. al., 1970; Glynn, 1964; Repke, 1964; Schwartz et. al., 1969). 이러한 ATPase 활성의 억제는 digitalis 강심배당체가 갖는 작용중 세포하수준에서 봤을때 가장 뚜렷하고, 유일한 생화학적현상으로서, 그 억제정도가 digitalis배당체들의 강심효과정도와 비례하고(Lee et. al., 1969: Repke et. al., 1963: Repke, 1964), 또 동물의 종에 따른 강심효과 차이의 정도와도 비례(Akera et. al. 1969: Allen and Schwartz: 1969: Erdmann and Schoner, 1973)한다는 점 등으로 digitalis 배당체의 강심작용기전과 직접 또는 간접적으로 상관관계가 있을 것으로 추정되고 있다.

상기한 관점에서 본 실험결과와 같이 Na^+이 심근 mitochondria에서부터 Ca^{++}을 현저히 유리하고, K^+이 같이 첨가 됐을때는 Na^+/K^+비에따라 클수록 Ca^{++} 유리가 더욱 증가하는 현상은, mitochondria가 심근의 경우 세포내 Ca^{++} 조절기구로서의 역할이 중시되고 있고, 세포내 Na^+의 증가 및(또는) K^+의 감소가 digitalis 배당체에 의한 Na^+, K^+-ATPase 활성의 억제결과로 초래될 수 있는 것이라고 볼때 digitalis 배당체의

강심작용기전을 설명하는데 있어서 흥미로운 결과라고 여겨졌다.

한편 이러한 현상이 실제로 in vivo에서 digitalis배당체의 강심기전으로 설명될 수 있기 위해서는 유효강심작용을 나타내는 소량의 digitalis배당체에 의해서도 세포내 Na^+증가 및(또는) K^+감소가 초래될 수 있을 것인가 하는 점과 또 그 양이 mitochondria에서 Ca^{++}을 유리하므로서, 심근수축을 증가시키기에 충분한 세포내 Ca^{++}농도를 올릴 수 있을 것인가를 규명하지 않으면 안되겠다. 지금까지의 보고에 의하면 ouabain이 유효강심작용을 나타내는 농도인 10^{-7}M 이하에서는 세포내의 Na^+또는 K^+농도에 거의 일정한 변화를 일으키지 않으며, 오직 독작용을 나타내는 높은 농도에서만 Na^+증가 및 K^+감소를 보인다고 하였다(Lee and Klaus, 1971). 그러나 방법상에 있어서 실제로 작용하는 형인 유리형의 Na^+ 및 K^+만을 세포내에서 측정할 만족할 만한 방법이 현재까지도 없다는 사실로 볼 때 보고들에서와 같이 세포내의 유리형 및 결합형을 합한 총 Na^+ 또는 K^+을 측정하여 변화 유무를 판정한다는 것은 설사 유리형의 증감이 어느 정도 있다하더라도 범위가 아주 크지 않을 때는 충분히 간과될 수 있는 것이기 때문에 뭐라 말할 수 없겠다. 그러나 최근 Lee and Fozzard(1975)는 cation-selective glass microelectrode를 사용하여 세포내 유리 Na^+ 및 K^+을 측정한 보고에서 가토심실 유두근의 세포내 유리 Na^+ 및 K^+농도가 각각 82~83mM, 6~7mM이라고 하였으며, 잇따라 Lee등 (personal communication)은 Na^+-sensitive한 glass로 만든 microelectrode를 사용하여 심근 Purkinje fiber에서 세포내 유리 Na^+를 직접 측정하였던 바 역시 약 7mM이었으며 이때 유효강심농도의 ouabain을 처치할 경우 Na^+이 11 mM 정도로 증가하였다가 세척하면 원상으로 다시 돌아간다고 하였다.

한편 Akera and Brody(1978)는 computer 모방 실험결과에서 심근세포내 유리 Na^+이 매수축—이완주기에 따라 수축초기에 증가했다가(Na^+ transient) 이완시에는 다시 원상수준으로 돌아간다고 하였으며 이때 Na^+, K^+-ATPase 활성을 40%정도 억제할 수 있는 강심농도의 ouabain이 Na^+ transient를 현저히 증가시킨다고 최근에 보고하였다.

이상의 보고들과 본실험 결과를 종합해 볼때 ouabain이 직접적으로는 Na^+에 의한 mitochondria의 Ca^{++} 유리작용에 영향을 미치지는 않았으나, in vivo에서는 세포막의 Na^+, K^+-ATPase를 억제하므로서 초래될 수 있는 세포내의 Na^+증가 및(또는) K^+감소가 간접적으로 mitochondria에서 Ca^{++}유리를 증가하므로서 심근세포내의 Ca^{++}수준을 올리고 따라서 E-C coupling을 촉진하여 강심작용을 나타낼 수 있을 것으로 사료하였다.

요 약

가토 심실근에서 추출한 mitochondria에서 Na^+ 및 K^+이온에 의한 Ca^{++}유리작용을 관찰하였다.

반응액에 첨가한 1-3mM의 소량 Na^+은 mitochondria막에 미리 결합되어있던 Ca^{++}을 현저히 유리시켰으며, K^+은 단독으로는 Ca^{++}유리를 유도하지 않았으나 Na^+에 의한 Ca^{++}유리에 대하여는 Na^+/K^+비에 따라 그것이 클수록 Ca^{++}유리를 증가시켰다.

간 및 신장 mitochondria에서도 Na^+에 의한 Ca^{++} 유리현상을 보였으나 심근mitochondria에 비하여 Na^+에 대한 감수성이 훨씬 미약하여 약 1/10~1/5에 지나지 않았다.

이와같은 mitochondria의 Ca^{++} 유리현상은 비교적 Na^+에 특이한 작용이었으며 다른 일가양이온중에서는 Li^+에 의해서만 어느 정도 보였다.

부전심근 mitochondria에서의 Na^+에 의한 Ca^{++}유리는 정상심근 mitochondria에서와 같았으며 이때 digitalis 강심배당체가 직접적으로는 별 영향을 미치지 않았다.

이상에서 심근의 경우 mitochondria는 세포내 Ca^{++}을 조절할 수 있는 기구로서 심근수축의 E-C coupling 과정에서 세포막의 전기적 흥분현상과 결부하여 Ca^{++}을 유리할 수 있을 것으로 추정하였으며, 한편 digitalis배당체의 강심작용기전에 있어서는 digitalis 배당체에 의한 세포막의 Na^+, K^+-ATPase 억제결과 초래될 수 있는 세포내의 Na^+증가 및(또는) K^+감소가 간접적으로 mitochondria에서부터 Ca^{++}유리를 증가하여 E-C coupling 과정을 촉진할 수 있을 것을 사료하였다

* 본 연구 수행에 있어서 시종 지도를 아껴주시지 않은 뉴욕주립대학 다운스테이트 메디칼센터 약리학교실의 이광수 교수님께 진정으로 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

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

Akera, T., Larsen, F.S., Brody, T.M. (1969): *The effect of ouabain on sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J. Pharmacol. Exp. Ther. 170:17-26.*

Akera, T., Brody, T.M. (1978): *The Role of Na^+, K^+-ATPase in the inotropic action of Digitalis. Pharmacol. Rev. 29:187-220.*

Albers, R.W. (1967): *Biochemical aspects of active transport. Ann. Rev. Biochem. 36:727-756.*

Allen, J.C., Schwartz, A. (1969): *A possible biochemical explanation for the insensitivity of the rat to cardiac glycosides. J. Pharmacol. Exp. Ther. 168:42-46.*

Besch, H.R., Allen, J.C., Glick, G., Schwartz, A. (1970): *Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171:1-12.*

Carafoli, E. (1974): *Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. Bioch. Soc. Symp. 39:89-109.*

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

Chance, B. (1965): *The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. J. Biol. Chem. 240:2729-2748.*

Chimoskey, J.E., Gergley, J. (1968): *Effect of ions on sarcoplasmic reticulum fragments. Arch. Biophy. Biochem. 128:601-605.*

Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C.S., Gamble, R.L., Lehningher, A.L., (1965): *The steady state maintenance of accumulated Ca^{++} in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 240: 2712-2720.*

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

Ebashi, S., Endo, M. (1968): *Calcium ion and muscle contraction. Prog. Biophys. Mol. Biol. 18:123-183.*

Ebashi, S., Lipmann, F. (1962): *Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. J. Cell. Biol. 14:389-400.*

Erdmann, E., Schoner, W. (1973): *Ouabain receptor interactions in Na^+, K^+-ATPase preparations from different tissues and species. Biochim. Biophys. Acta. 307:386-398.*

Fawcett, D.W., McNutt, N.S. (1969): *The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. J. Cell. Biol. 42:1-45.*

Fanburg, B., Finkel, R.M., Martonosi, A. (1964): *The role of calcium in the mechanism of relaxation of cardiac muscle. J. Biol. Chem. 239:2298-2306.*

Fleckenstein, A. (1964): *Metabolic aspects of the excitation-contraction coupling. The Cellular Functions of Membrane Transport. Prentice Hall. pp.71-93.*

Fozzard, H.A. (1977): *Heart: Excitation-Contraction Coupling. Ann. Rev. Physiol. 39: 201-220.*

Fuchs, F. (1974): *Striated muscle. Ann. Rev. Physiol. 36:461-502.*

Glynn, I.M. (1964): *The action of cardiac glycosides on ion movement. Pharmacol. Rev. 16:381-407.*

Harigaya, S., Schwartz. A. (1969): *Rate of calcium binding and uptake in normal and failing cardiac muscle: Membrane vesicles (relaxing system) and mitochondria. Cir. Res. 25:781-794.*

Hasselbach, W., Makinose, M. (1963): *Über der Mechanismus des Calcium Transportes durch die Membranen des Sarcoplasmatischen Reticulums. Biochemische Zeitschrift. 399:94-111.*

Laguens, R. (1971): *Morphometric study of myocardial mitochondria in the Rat. J. Cell. Biol. 48:673-676.*

Lee, C.O., Fozzard, H.A. (1975): *Activities of Potassium and Sodium Ions in Rabbit Heart Muscle. J. Gen. Physiol. 65:695-708.*

Lee, K.S., Choi, S.J. (1966): *Effect of the cardiac glycoside on the Ca^{++} uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 153:114.*

Lee, K.S., Shin, M.R., Kang, D.H., Chan, K.K.

(1969): *Studies on the mechanism of Cardiac glycoside action. Biochem. Pharmacol. 19: 1055-1059.*

Lee, K.S., Klaus, W. (1971): *The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. Pharacol. Rev. 23: 193-261.*

Lee, K.S., Lee, C.O., Kang, D.H.: *Personal Communication.* Lehninger, A.L., Carfoli, E., Rossi, C.S. (1967): *Energy-linked ion movements in mitochondrial system. Adv. Enzy. 29:259-320.*

Lehninger, A.L. (1970): *Mitochondria and calcium ion transport. Biochem. J. 119:129.*

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S. (1951): *Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.*

Page, E., McCallister, L.P, (1973): *Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Am. J. Cardiol. 31:172-181.*

Patriaca, P., Carafoli, E (1968): *A study of the intracellular transport of calcium in rat heart. J. Cell. Physiol. 72:29-38.*

Reed, P.W., Lardy, H.A. (1972): *A23187: a divalent cation ionophore. J. Biol. Chem. 247:6970-6977.*

Repke, K., Portius, H.J. (1963): *Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. Experientia. 19:452-458.*

Repke, K. (1964): *Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis. Klin. Wochensch. 42:157-165.*

Reuter, H. (1973): *Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Prog. Biophys. Mol. Biol. 26:1-43.*

Reuter. H. (1974): *Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance. Cir. Res. 34:599-605.*

Ringer, S. (1883): *A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J. Physiol(London) 4:29-42.*

Rossi, C.S., Vasington, F.D., Carofoli, E. (1973): *The effect of ruthenium red on the uptake and release of Ca^{++} by mitochondria. Bioch. Biophy. Res. Comm. 50:846-852.*

Scarpa, A., Graziotti, P. (1973): *Mechanism of intracellular calcium regulation in heart. I. Stopped-flow measurements of Ca^{++} uptake by cardiac mitochondria. J. Gen. Physiol. 62:756-772.*

Schwartz, A., Allen, J.C., Harigaya, S. (1969): *Possible involvement of cardiac Na^+, K^+-ATPase in the mechanism of action of cardiac glycosides. J. Pharmacol. Exp. Ther. 168:31-41.*

Schwartz, A., Sordahl, L.A., Entman, M.L., Allen, J.C., Reddy, Y.S., Ann Goldstein, M., Luchi, R.J., Wybormy, L.E. (1973): *Abnormal biochemistry in myocardial failure. Am. J. Cardiol. 32:407-422.*

Skou, J.C. (1965): *Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45:596-617.*

Sordahl, L.A., Wood, W.G., Schwartz, A. (1970): *Production of cardiac hypertrophy and failure in rabbits with Ameroid clips. J. Mol. Cell. Cardiol. 1:341-344.*

Sordahl, L.A., McCollum, W.B., Wood, W.G. (1973): *Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. Am. J. Physiol. 224:497-502.*

Sordahl, L.A. (1974): *Effects of magnesium, ruthenium red and the antibiotic ionophore A-23187 on initial rates of calcium uptake and release by heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophy. 167:104-115.*

Sulakhe, P.V., Dhalla, N.S. (1971): *E-C coupling in heart. VII. Calcium accumulation; subcellular particles in congestive heart failure. J. Clin. Invest. 50:1019-1027.*

Weber, A., Herz, R., Reiss, I. (1963): *On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 46:679-702.*

Weidmann, S. (1958): *Effect of increasing the calcium concentration during a single heart beat. Experientia. 15:128.*