

心臟筋 Sarcoplasmic Reticulum 에서의 Ca^{++} 과 Na^{+} 에 依한 Ca^{++} 遊離作用

The Ca^{++} -and Na^{+} -induced Ca^{++} Release from Isolated Cardiac Sarcoplasmic Reticulum

서울大學校 醫科大學 藥理學教室

金 慧 媛 · 金 明 石 · 朴 贊 雄

緒 論

칼슘이 심장근 수축에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀진 이래(Ringer, 1883) 정상적인 또는 병리적인 심장에서의 수축기전과 칼슘과의 관계에 관하여 많이 연구되어 왔음은 주지의 사실이다.

심장근 수축시 활동전압이 근세포막(sarcolemma)을 탈분극시키고 이에 의하여 칼슘저장소로부터 유리된 Ca^{++} 이 심장근 수축단백질 중 Ca^{++} 수용체인 troponin C에 결합하여 actin과 myosin 결합을 가능하게 하여 수축을 일으키고, 이 Ca^{++} 이 troponin C로부터 다시 분리되어 칼슘저장소로 축적되므로써 이완이 일어난다. 이 일련의 과정, 즉 excitation-contraction coupling (E-C coupling) 과정에 칼슘이 절대적이라고 지금까지는 받아들여지고 있다(Ebashi, 1976; Fozzard, 1977).

또한 수축시 심장근 수축단백질과 결합하는 칼슘의 근원으로는 세포외액, sarcoplasmic reticulum, 미토콘드리아가 생각되고 있다.

세포외액의 Ca^{++} 은 수축에 반드시 필요하다고 생각되나, 활동전압 발생시 근세포막을 통하여 세포내로 들어오는 Ca^{++} 은 직접적으로 수축을 일으키기에는 충분한 양이 못되므로(Reuter, 1974) 수축에 필요한 칼슘의 근원은 세포외액만 아니라 세포내 칼슘저장소도 관여하리라고 추정된다. 일반적으로 골격근에서는 세포내에서 칼슘을 유리하는 장소가 sarcoplasmic reticulum 이라고 받아들여지고 있으나 (Ebashi and Lipmann, 1962; Sandow, 1965; Fuchs, 1974; Ebashi, 1976; Endo, 1977) 심장근에서는 골격근에 비하여 sarcoplasmic reticulum이 적게 존재하고, 배열이 조직적이 아닌 만

번에(Chimoskey and Gergely, 1968; Fawcett and McNutt, 1968; Page and McCallister, 1973) 상대적으로 미토콘드리아가 풍부하며(Laguens, 1971) 충분한 양의 Ca^{++} 을 축적할 수 있는 능력도 있으므로 미토콘드리아가 유리 칼슘의 주근원이라고 주장하는 사람들도 있다(Carafoli, 1974, 1975; Affolter et al., 1976). 그러나 심장근에서는 골격근에서보다는 존재하는 sarcoplasmic reticulum의 양은 적으나, 칼슘을 조절할 수 있는 능력이 정상 수축-이완을 일으키기에 충분하다고 주장하는 사람들이 또한 많다(Fabiato and Fabiato, 1975a, 1977a, 1978; Kitazawa, 1976; Chapman, 1979).

Sarcoplasmic reticulum으로부터의 칼슘 유리기전은 두가지로 생각되고 있다. 첫째는 활동전압이 transverse tubule을 통하여 전달되어 sarcoplasmic reticulum을 탈분극시킴으로써 Ca^{++} 에 대한 투과성을 증가시켜 Ca^{++} 유리를 초래한다는 "탈분극에 의한 Ca^{++} 유리(Depolarization-induced Ca^{++} release)" (Baylor and Oetliker, 1975; Blinks et al., 1978)이고, 둘째는 활동전압 발생시 근세포막을 통하여 세포내로 들어오는 적은 양의 Ca^{++} 이 근장그물로부터 수축에 충분한 Ca^{++} 을 유리시킨다는 " Ca^{++} 에 의한 Ca^{++} 유리(Ca^{++} -induced Ca^{++} release)" (Endo et al., 1970; Ford and Podolsky, 1972a, b; Fabiato and Fabiato, 1972, 1975a, 1977a, b, 1978, 1979; Katz et al., 1977a, b)이다.

현재의 추세로는 골격근에서는 탈분극에 의한 Ca^{++} 유리가 sarcoplasmic reticulum으로부터의 Ca^{++} 유리기전으로(Baylor and Oetliker, 1975; Endo, 1977), 심장근에서는 Ca^{++} 에 의한 Ca^{++} 유리가 sarcoplasmic reticulum으로부터의 Ca^{++} 유리기전으로 유력시 되고 있다(Fabiato and Fabiato, 1972, 1975a, 1977a, b, 1978, 1979; Kirchberger et al., 1977; Kirchberger and

* 본 연구의 일부는 1981년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 이루어졌음.

Wong, 1978, 1980).

정상적인 심장에서의와는 달리 심부전증 환자에서는 digitalis 강심배당체의 사용이 심근 수축력을 증가시킨다는 점은 잘 알려졌으나 그 작용기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 현재까지는 digitalis 강심배당체가 Na⁺, K⁺-ATPase를 특이적으로 억제하여 세포내 Na⁺ 농도를 증가시키고, 작용기전은 분명하지 않으나 세포내 교환 가능한 free Ca²⁺ 농도를 증가시켜 E-C coupling 과정을 촉진시킬 것이라 추정되고 있다(Lee and Klaus, 1971). 그런데 심장근 미토콘드리아로부터 Na⁺에 의하여 특이적으로 Ca²⁺이 유리된다는 보고들이 있어(Carafoli; 1974; Crompton et al., 1976, 1977, 1978; 金, 1978; 金 등, 1981), 미토콘드리아로부터 또는 세포내 다른 기구로부터 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리가 digitalis 강심배당체의 작용기전을 설명할 수 있지 않나 생각되고 있다.

본 실험에서는 심장근에서 칼슘유리의 근원이라 주장되는 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca²⁺ 유리 작용기전을 관찰하고자 하였다. 여러 사람들에 의하여 보고된 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca²⁺에 의한 Ca²⁺ 유리작용과, 미토콘드리아에서 Ca²⁺ 유리에 관여한다는 Na⁺에 의한 특이적인 Ca²⁺ 유리가 sarcoplasmic reticulum에서도 존재하는가를 비교 관찰하고자 하였다.

實驗方法

1. Sarcoplasmic reticulum의 추출

돼지 심실근에서 약간 변형시킨 Harigaya와 Schwartz (1969)의 방법에 의하여 sarcoplasmic reticulum을 추출하였다. 심장에서 지방조직과 결체조직을 제거한 심실근 만을 분리하여, 냉각시킨 homogenising 용액(0.25M sucrose, 0.1mM Tris-HCl, pH 6.8)에 넣고 가위로 잘게 자른 다음 10배 용량의 동일 homogenising 용액에서 polytron 조직 분쇄기(Kinematica PCU-2-110, Switzerland)로 균질화한 후, 1,000×g에서 10분 냉동 원심분리하여 상등액을 4겹의 가재(gauze)를 통하여 여과한 다음 다시 9,000×g에서 20분 냉동 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 35,000×g로 60분 냉동 원심분리하여 얻은 sarcoplasmic reticulum을 다시 3~4배 용량의 동일 homogenising 용액에 부유시켜 35,000×g에서 20분 냉동 원심분리하여 최종 sarcoplasmic reticulum을 얻었다.

이 sarcoplasmic reticulum을 0.25M sucrose, 0.1mM Tris-HCl, pH 6.8 용액에 단백질 농도가 1mg/ml가 되도록 glass teflon homogenizer를 이용하여 부유시켰

다. 위의 조작은 모두 0~4°C에서 행하였고, 단백질 농도는 Lowry(1951) 방법으로 측정하였다.

2. Sarcoplasmic reticulum의 Ca²⁺ 흡수와 유리

Sarcoplasmic reticulum의 Ca²⁺ 흡수와 유리는 방사성 동위원소 ⁴⁵Ca를 이용하여 Milipore filtration법(Lee and Choi, 1966)으로 측정하였다. 25°C 진탕 수욕조에서 흡수반응액(20mM Tris-maleate 또는 40mM histidine-HCl buffer pH 6.8, 100mM KCl, 10~200μM CaCl₂+⁴⁵Ca, vesicular uptake 또는 matrix loading을 시키기 위해서는 50mM potassium phosphate도 첨가)이 있는 용기에 0.05~0.2mg/ml의 sarcoplasmic reticulum과 5mM MgATP를 첨가시킴으로써 흡수반응을 시작하였다.

Ca²⁺에 의한 Ca²⁺ 유리를 관찰하기 위하여 50mM potassium phosphate를 넣은 흡수반응액에 ATP-regenerating system (10mM creatine phosphate, 0.1mg/ml creatine phosphokinase)을 첨가하여 25°C 진탕수욕조 상에서 시간에 따른 칼슘 uptake를 관찰하면서, 동시에 다른 용기에는 동일 반응조건에서 처음 cold 칼슘만을 흡수시켜 Ca²⁺ 흡수가 일정 수준에 도달하였을 때 반응액내 Ca²⁺ 농도에 영향을 주지 않을 정도의 적은 양의 ⁴⁵Ca를(0.4μCi/ml) 첨가함으로써 평형상태에서 ⁴⁵Ca가 흡수되는율을 측정하여 칼슘의 unidirectional efflux율을 구하였다. 즉 ⁴⁵Ca를 첨가한 후 일정한 시간 간격으로 0.3ml를 뽑아 Milipore filter(HAWP 13mm, average pore size 0.45μ)에 옮겨 즉시 음압하에서 여과하였다. 이 여액 0.1ml를 10ml의 liquid scintillation cocktail(Bray's solution)이 들어 있는 병에 첨가하여 liquid scintillation spectrometer(Nuclear Enterprises, England)로 ⁴⁵Ca의 방사능을 측정하여 칼슘 efflux양을 계산하였다.

Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리를 관찰하고자, 칼슘 흡수가 최대로 된 상태에서 반응액 1ml를 0.5mM ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid (EGTA)만 또는 0.5mM EGTA와 1~10mM Na⁺이 들어있는 용기에 옮겨 동일조건인 진탕 수욕조상에서 반응시키면서 일정 시간간격으로 뽑아 앞에서와 같은 방법으로 유리 칼슘의 양을 계산하였다.

實驗結果

1. Ca²⁺에 의한 Ca²⁺ 유리작용

칼슘농도가 다른 여러 경우에 50mM potassium phosphate를 포함한 반응액 내에서의(vesicular uptake 또는 matrix loading) 시간에 따른 근장근물의 칼슘

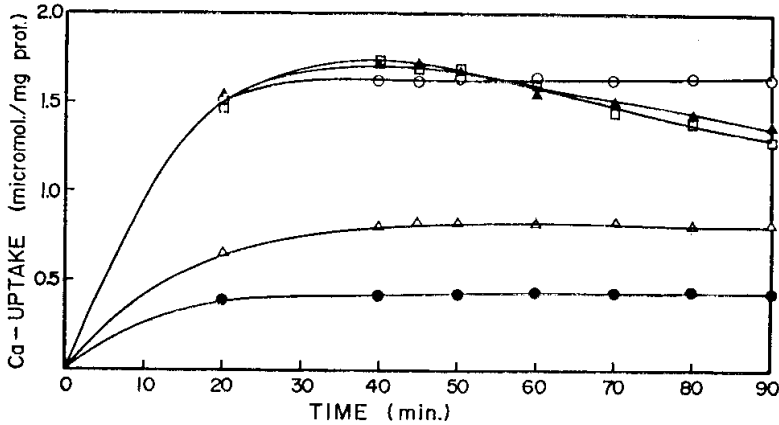


Fig. 1. Time course of calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum incubated in the medium containing 50 μ M (●), 100 μ M (△), 120 μ M (○), 150 μ M (▲), and 180 μ M (□) of calcium, 50mM inorganic phosphate and ATP-regenerating system.

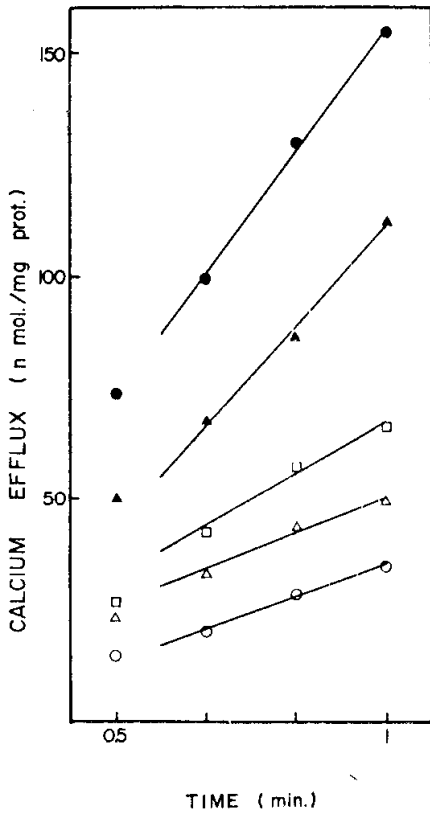


Fig. 2. Calcium efflux at steady state calcium uptake. External remaining calcium concentrations are 2.75 μ M (○), 6.79 μ M (△), 10.65 μ M (□), 12.92 μ M (▲), and 24.76 μ M (●).

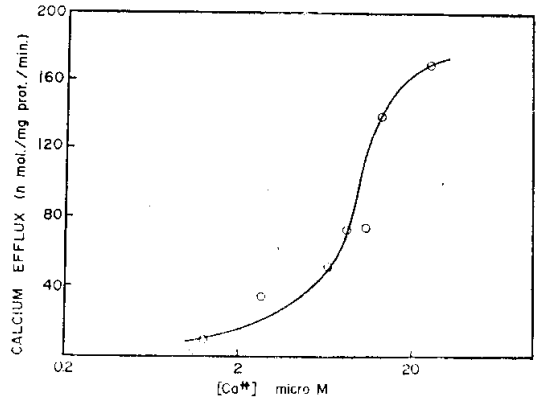


Fig. 3. Calcium dependence of calcium efflux from cardiac sarcoplasmic reticulum.

uptake는 반응 40~50분에서 최대흡수를 보이며, 비교적 칼슘농도가 낮은 경우에는 흡수된 칼슘이 상당시간 동안 그대로 유지됨을 볼 수 있으나, 높은 농도의 칼슘용액에서는 시간에 따라 자연적으로 Ca²⁺이 유리되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

Cold 칼슘만으로 반응시켜 흡수반응이 평형상태에 도달하였을 때 미량의 ⁴⁵Ca를 첨가함으로써 초기 Ca²⁺ influx를 측정하여 Ca²⁺ efflux를 구하였다. 반응액 내 잔여 Ca²⁺이 1 μ M에서 20 μ M로 증가함에 따라 칼슘 efflux는 증가하였고(Fig. 2), 잔여 Ca²⁺ 농도와 칼슘 efflux율과의 관계는 saturation kinetics을 보이는 sigmoid곡선을 나타내었다. 최대 속도(V_{max})는 180 nmol. Ca/mg/min., K_{Ca}(칼슘 efflux의 속도가 최대 속도의 절반에 해당될 때의 칼슘 농도)는 7 μ M이었다(Fig. 3).

2. Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리작용

5×10⁻⁸M에서 5×10⁻⁶M까지의 Ca²⁺ 농도에서 sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수(membrane binding)는 최대값이 40nmol/mg protein인 sigmoid곡선을 보이며, 최대값의 절반이 흡수되는 Ca²⁺ 농도는 4×10⁻⁶M이었다(Fig. 4). 위와같은 여러 Ca²⁺ 농도 중에서 최대 흡수될 일으킬 수 있는 충분한 Ca²⁺ 농도인 10⁻⁵M의 반응용액 내에서 시간의 경과에 따른 칼슘흡수는 5분에서 최대값을 보이며 시간의 경과에 따라 자연적으로 다소 유리되는 현상을 보여주고 있다(Fig. 5). 최대 흡수반응을 일으킨 상태에서 0.5mM EGTA만을 또는 0.5mM EGTA와 1~10mM Na⁺을 첨가시켰을 때 유리되는 칼슘은 41.97%~45.18%로, Na⁺ 첨가에 의한 칼슘 유리는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6A). 또한 반응액 내에 50mM potassium phosphate를 첨가하여 흡수시킨 칼슘의 유리를 관찰한 경우도 11.43%~12.40%로 역시 유의한 차가 없었다(Fig. 6B). 이 실험에서는 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리를 특별히 관찰하기 위하여 칼슘 chelator인 EGTA를 첨가하여 일단 유리된 칼슘은 다시 sarcoplasmic reticulum이 흡수하지 못하도록 하였으므로 위의 결과는 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리가 근장그물에서는 없는 것을 보여주며 EGTA에 의하여는 흡수된 칼슘이 유리된다기 보다는 근장그물막 표면에 비특이적으로 부착되었던 칼슘을 EGTA가 chelation한 것으로 여겨진다.

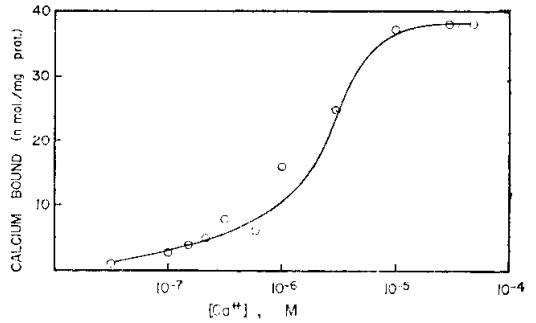


Fig. 4. Calcium binding at various calcium concentrations.

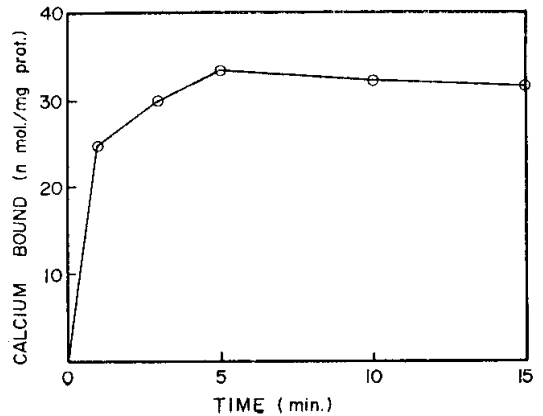


Fig. 5. Calcium binding at 10⁻⁵M of free calcium concentration.

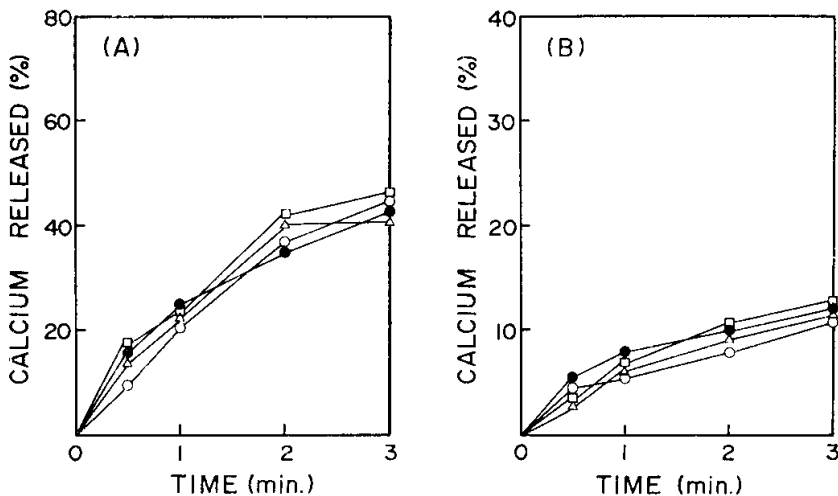


Fig. 6. Na⁺ induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum under the presence of 0.5mM EGTA. Sarcoplasmic reticulum vesicles were incubated in the absence(A) or presence (B) of the 50mM inorganic phosphate. Na⁺; 0mM(○), 1mM(△), 5mM(●), and 10mM(□).

3. Na⁺과 K⁺비율이 Ca²⁺ 유리에 미치는 영향

한편 sarcoplasmic reticulum에서 Na⁺과 K⁺의 비율이 Ca²⁺ 흡수나 유리에 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 반응액 내의 Na⁺과 K⁺의 비율을 여러 경우로 하여 최대로 반응시킨 후 흡수된 칼슘의 양을 비교한 결과 Na⁺과 K⁺의 비율이 Ca²⁺ 흡수에 영향을 미치지 않았고(Fig. 7), 같은 조건으로 최대 반응을 시킨 후 Na⁺과 K⁺이 미리 들어 있는 다른 용기에 일정량씩 옮겨 마지막 농도가 위의 Na⁺과 K⁺의 비율과 동일하게 하여 유리되는 Ca²⁺을 관찰하여도 Na⁺과 K⁺의 비율이 Ca²⁺유리에 영향을 주지 않았다.(Fig. 8).

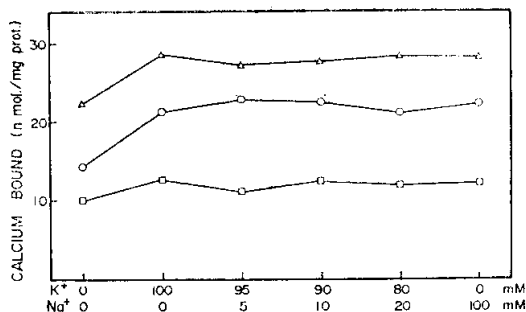


Fig. 7. Influence of Na⁺/K⁺ ratio on the calcium binding. Total calcium concentrations in the media are 10μM(□), 20μM(○), and 30μM(△).

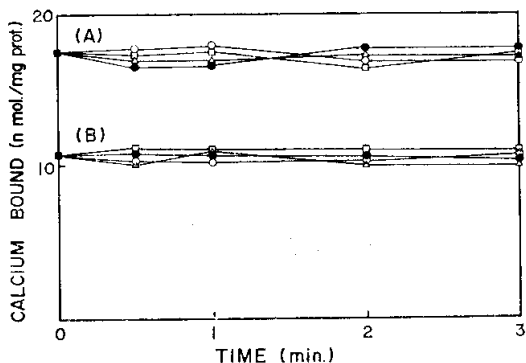


Fig. 8. Influence of Na⁺/K⁺ ratio on calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum after maximum binding (■) of calcium. Calcium concentrations in reaction media are 20μM(A), and 10μM(B). (○: Na⁺ 0mM, K⁺ 100mM, ●: Na⁺ 5mM, K⁺ 95mM, △: Na⁺ 10mM, K⁺ 90mM, and □: Na⁺ 20mM, K⁺ 80mM).

考 察

Ringer(1883)가 칼슘을 포함하지 않는 반응용액에

서 심장의 박동이 정지한다는 사실을 보고한 이래 정상적인 심장근에서는 세포외액의 칼슘이 수축에 반드시 필요하다고 생각되어 왔고, Solaro등은(1974) Ca²⁺농도가 1.7×10⁻⁷M에서는 장력 발생이 없던 것이 9×10⁻⁶M에서는 95%, 3×10⁻⁵M에서는 100%의 장력을 발생하는 것을 관찰하여 반응용액의 칼슘 농도를 증가시키에 따라 장력이 증가함을 보여주고 있다. 그러나 이와같이 세포외액의 칼슘이 수축에 절대적이라는 생각과 더불어 심장근 박동시 근세포막을 통한 칼슘의 최대 influx는 10μmol/kg wet heart/beat이하로 수축을 일으키기에 충분한 Ca²⁺ 양의 약 10%밖에 안된다는 보고를 볼 때(Langer, 1976), 세포외액 외에 세포내에도 칼슘을 방출하는 기구가 있다고 생각할 수 있다.

골격근에서는 세포내 칼슘 이온 농도가 sarcoplasmic reticulum에 의하여 전적으로 조절된다고 주장되는데(Ebashi and Lipmann, 1962; Sandow, 1965; Fuchs, 1974; Ebashi, 1976; Endo, 1977) 반하여 심장근에서는 아직 분명치 않다. 왜냐하면 심장근 sarcoplasmic reticulum은 골격근의 sarcoplasmic reticulum에 비하여 존재하는 양이 적고, 칼슘 uptake능력이 적은 반면에(Fawcett and McNutt, 1969; Harigaya and Schwartz, 1969), 상대적으로 미토콘드리아가 풍부하고(Laguens, 1971) 또한 칼슘 축적능력이 크다고 생각되기 때문이다. 그러나 칼슘을 축적하고 또 축적된 칼슘을 유리할 수 있는 sarcoplasmic reticulum의 능력이, 정상적인 심장의 매 박동시 수축-이완을 조절하기에 충분하다고 주장하는 보고가 많으며, 칼슘을 침전시키는 물질인 pyroantimonate를 사용하여 포유류 심장근의 세포내 칼슘축적장소를 조사한 결과 sarcoplasmic reticulum에 주분포를 이루고 있다는 보고도 있다(Legato and Langer, 1969). Kitazawa(1976)는 심장근 sarcoplasmic reticulum과 미토콘드리아를 비교 실험한 결과 100μM의 칼슘 농도에서 초기 칼슘 uptake율이 sarcoplasmic reticulum의 경우 20~30n mol.Ca/mg/sec., 미토콘드리아의 경우 0.64 nmol.Ca/mg/sec. (pH 6.8)이고, apparent calcium binding constant는 sarcoplasmic reticulum의 경우 2.0×10⁶M⁻¹, 미토콘드리아의 경우 5.9×10⁴M⁻¹(pH 6.8)이며, 최대 수축된 심장근섬유 70%를 이완시킬 수 있는 sarcoplasmic reticulum 양의 10배의 미토콘드리아로도 근이완을 일으키지 못함을 관찰하였다. Fabiato와 Fabiato(1975)는 심장근 skinned fiber의 수축이 azide와 ruthenium red처치에 의하여도 변화가 없음을 관찰하여 미토콘드리아는 이 수축을 일으키는데 관여하지 않으며, sarcoplasmic reticulum이 근수축에 필요한 칼

숨을 유리하는 창소임을 시사하고 있다. 이상의 예들을 종합하여 볼 때 심장근의 정상적인 수축-이완에 관여하는 칼슘의 세포내 유리-재흡수 기구로는 미토콘드리아보다는 sarcoplasmic reticulum이 훨씬 유력시되고 있다(Endo et al., 1970; Fabiato and Fabiato, 1975a; Kitazawa, 1976; Van Winkle and Schwartz, 1976; Will et al., 1976; Fozzard, 1977; Chapman, 1979).

위와 같은 사실을 기초로하여, 본 실험에서는 심장근 수축시 세포내 칼슘 농도를 증가시키는 작용기전에 관해 고찰해 보기로 하겠다.

sarcoplasmic reticulum으로부터의 Ca[#] 유리기전은 탈분극에 의한 Ca[#] 유리와 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리의 두 가지로 달리 설명되고 있다. 탈분극에 의한 Ca[#] 유리로는, 분리한 골격근 섬유를 직접 전기자극하여 탈분극을 시킨 경우나 (Baylor and Oetliker, 1975; Blinks et al., 1978) sarcoplasmic reticulum을 포함한 반응용액내 이온 조성(ionic composition)을 급격히 변화시켜 sarcoplasmic reticulum의 소위 “화학적 탈분극(chemical depolarization)”을 일으킨 경우에 칼슘 투과성이 증가함을 관찰하여 세포막 전위의 탈분극에 따른 sarcoplasmic reticulum의 탈분극이 수축에 필요한 칼슘을 유리시킬 것이라는 주장도 있으나(Kasai and Miyamoto, 1976a, b), 현재 심장근에서는 외부로부터 유입된 적은 양의 칼슘이 sarcoplasmic reticulum에서의 충분한 양의 Ca[#] 유리를 유발하여 수축을 발생하게 한다는 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리가 더 유력시되고 있다. 왜냐하면 직접 전기자극을 한 경우에는 전기자극에 의한 전해로 인하여 sarcoplasmic reticulum에 비가역적인 손상을 주게 되며(Miyamoto and Kasai, 1973), 보다 침투하기 용이한 Cl⁻와 같은 음이온을 치환한 경우에는 음이온 전하 자체에서 오는 변화가 아니라 음이온 치환에 따른 삼투 효과에 기인하여 Ca[#]이 유리되는 것이라고 지적되고(Fabiato and Fabiato, 1977; Chapman, 1979) 있는 반면에, Endo 등(1970)이 골격근 skinned fiber에서 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리작용을 보고한 후 sarcoplasmic reticulum에서의 유리는 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리작용이 주된 기전이라고 주장하는 보고들이 또한 많기 때문이다(Ford and Podolsky, 1972a, b; Fabiato and Fabiato, 1972, 1975, 1977a, b, 1978, 1979; Katz et al., 1977a, b; Kirchberger and Wong, 1978, 1980).

본 실험에서도 Kirchberger와 Wong의 보고(1978, 1980)에서와 마찬가지로 반응용액내의 칼슘 농도가 높은 경우 시간의 경과에 따라 자연적으로 칼슘이 유리

되며, 낮은 칼슘농도에서는 uptake된 양이 상당시간 일정하게 지속되는 경향을 보이고, 칼슘을 최대 uptake 시킨 후 평형상태에서 ⁴⁵Ca를 첨가하여 unidirectional calcium efflux를 비교 관찰할 때 반응용액내 잔여 Ca[#] 농도가 1 μ M에서 20 μ M로 증가됨에 따라 Ca[#] efflux도 증가함을 보여, sarcoplasmic reticulum으로부터 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리가 있음을 알 수 있다. 칼슘 uptake의 최대속도(V_{max})가 180 nmol/mg/min., 최대 속도의 절반정도 촉진되는 반응액내 잔여 Ca[#] 농도는 7 μ M이며, 또 반응 용액내 free Ca[#]과 칼슘 efflux의 관계가 sigmoid곡선을 그린다는 점은 다른 보고(Kirchberger et al., 1977; Kirchberger and Wong, 1978)와 유사하였다.

본 실험과 마찬가지로 sarcoplasmic reticulum vesicle에서 ⁴⁵Ca를 이용하여 Ca[#]에 의한 Ca[#]유리를 관찰한 보고(Dunnett and Nayler, 1977; Kirchberger et al., 1977; Katz et al., 1977a; Kirchberger and Wong, 1978, 1980) 외에도 Fabiato와 Fabiato(1972, 1975a, 1977b, 1978)는 skinned 심장근 세포를 이용한 실험에서 반응액내의 칼슘농도를 2 $\times 10^{-8}$ M에서 6 $\times 10^{-8}$ M로 약간 변화시켜도 수축이 일어나며, 10⁻⁷M에서는 수축이 발생할 뿐 아니라 그 크기 또한 증가한다는 사실로부터 Ca[#]에 의하여 Ca[#] 유리가 일어난다는 주장을 하고 있다.

이러한 심장근 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca[#]에 의한 Ca[#] 유리는 Mg[#]에 의하여 억제되고 또 ADP에 의하여는 촉진되는 등(Fabiato and Fabiato, 1975a, b; Kirchberger and Wong, 1978, 1980)보다 복잡하게 영향을 받는 것으로 보고되어 왔으나, 정상 생리적인 심장근의 수축-이완에 있어서는 sarcoplasmic reticulum이 칼슘을 유리-재흡수하며 이것은 sarcoplasm내 칼슘에 의해 촉진된다는 것이 유력시되고 있다.

한편 심장근 수축시 활동전압 초기의 빠른 Na⁺의 유입으로 보아 수축발생에 Na⁺의 관련을 생각해 볼 수도 있다. 심부전증 환자에서 digitalis 강심배당체에 의한 심근수축력의 증가를 볼 수 있는데, 이 digitalis 강심배당체의 작용기전이 명확하지는 않으나 현재까지로는 세포막의 Na⁺-pump의 억제로 세포내의 Na⁺ 농도가 증가하고 이 Na⁺ 농도 증가가 세포내 Ca[#] 농도를 증가시켜 수축력이 증가하리라고 여겨지고 있어(Lee and Klaus, 1971), Na⁺ 농도 증가가 칼슘을 포함하고 있는 어떤 세포내 기구에서부터 칼슘을 유리할 것인가에 관해 관심을 가질 수 있을 것이다. 최근 미토콘드리아로부터 특이적으로 Na⁺에 의하여 Ca[#]이 유리된다는 것과 관련하여 digitalis 강심배당체의 가능한 강심 작용

기전의 하나로서 Na⁺-pump 억제로 세포내에 증가된 Na⁺이 간접적으로 미토콘드리아로부터 Ca²⁺을 유리시켜 강심작용을 나타내지 않나 하는 보고가 있다 (Carafoli, 1974, 1975; Crompton et al., 1976, 1977, 1978; 金, 1978; 金 등, 1981).

이러한 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리기전은 미토콘드리아에 서만 특이적으로 보이는 현상이라고 생각할 수만은 없으며 근세포막(sarcolemma)에서 Na⁺-Ca²⁺교환이 주된 현상임을 보고한 (Reuter, 1974; Lamers and Stinis, 1981) 것처럼, 정상 심장근에서 칼슘 조절에 주작용을 하리라 생각되는 sarcoplasmic reticulum에서도 충분히 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리기전이 있을 수도 있다고 생각되나 현재까지는 명확히 보고된 바가 거의 없었다. 그리하여 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리를 관찰한, 본 실험결과 sarcoplasmic reticulum에 칼슘을 흡수(membrane binding)시킨 경우나 근장그물 내부에 칼슘을 uptake시킨(vesicular uptake 또는 matrix loading) 경우 모두 Na⁺에 의하여 Ca²⁺이 유리되지 않았고, Na⁺과 K⁺의 비율을 변화시켜 칼슘을 uptake시킨 경우나 또는 uptake시킨 칼슘을 유리시킨 경우나 둘 다 전혀 영향을 미치지 않았는 바 이러한 결과는 Fabiato와 Fabiato (1977)가 skinned 심장근세포에 K⁺ 대신에 Na⁺을 치환하였을 때 수축이 일어나지 않음을 관찰하여 sarcoplasmic reticulum에서는 Na⁺-Ca²⁺ 교환은 일어나지 않는다고 한 보고와 유사하였다.

위의 결과들로 미루어 볼 때 심장근의 매 박동마다의 Ca²⁺ 조절은 sarcoplasmic reticulum에서 이루어지고, sarcoplasmic reticulum에서 Ca²⁺의 유리에는 Na⁺은 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, Ca²⁺에 의한 Ca²⁺ 유리가 심장근 수축에 필요한 Ca²⁺을 공급하는 작용기전의 하나라 생각된다.

그리고 칼슘 축적 능력에서 심장근 미토콘드리아는 sarcoplasmic reticulum과 여러가지 차이점(Kitazawa, 1976)을 보이며 미토콘드리아가 생리적인 심장근 칼슘 농도조절에 관여한다는 직접적인 증거들도 볼 수 없다. 그렇다고 미토콘드리아가 심장근에서의 세포내 칼슘 농도 조절에 전혀 관여하지 않으리라고 간주해 버릴 수 만도 없다. 왜냐하면 미토콘드리아가 Na⁺에 의해 Ca²⁺을 유리하고(Carafoli, 1974; Crompton et al., 1976, 1977, 1978; 金, 1978; 金 등, 1981) 근세포내 Ca²⁺ 농도가 4×10⁻⁷M 이상일 때는 비록 천천히 축적하기는 하지만 많은 양의 칼슘을 축적한다는 결과 (Fabiato and Fabiato, 1975), 100μM이상의 Ca²⁺농도에서 최대로 수축된 심장근은 미토콘드리아의 도움없이 sarcoplasmic reticulum만으로는 이완이 이루어지지 않는다

는 보고(Kitazawa, 1976)가 있으므로 정상적인 심근에서는 아닐지라도 병적인 심근에서의 미토콘드리아의 역할은 커질 것으로 생각할 수 있기 때문이며, 또 부전 심장근에서 digitalis강심배당체를 사용할 때 Na⁺-pump를 억제함으로써 증가된 Ca²⁺이 수축을 일으키기에 충분한 양은 못되나 sarcoplasmic reticulum로부터 Ca²⁺을 유리시키는 trigger로 작용하여 수축을 일으킬 만한 양의 Ca²⁺을 유리하리라 하는 가능성도 생각할 수 있기 때문이다.

要 約

돼지 심실근에서 추출한 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca²⁺과 Na⁺에 의한 Ca²⁺유리작용을 관찰하였다.

여러 경우의 칼슘 농도를 갖는 반응용액에서 시간에 따른 칼슘 uptake는 반응 40~50분에 최대값을 가지며 비교적 칼슘 농도가 낮은 경우에는 흡수된 칼슘이 상당기간 그대로 유지되었으나, 높은 농도의 칼슘 용액에서는 시간의 경과에 따라 칼슘이 자연적으로 유리되는 것을 볼 수 있었다.

반응액내 잔여 Ca²⁺이 1μM에서 20μM로 증가됨에 따라 칼슘 efflux는 증가하였고, 잔여 Ca²⁺ 농도와 칼슘 efflux와의 관계는 saturation kinetics를 보이는 sigmoid곡선을 보였다. 최대 속도(V_{max})는 180nmol. Ca/mg/min, apparent K_{ca}는 7μM이었다.

Sarcoplasmic reticulum의 칼슘 흡수는 5×10⁻⁸M에서 5×10⁻⁵M까지의 Ca²⁺ 농도에서 sigmoid곡선을 보였고, 최대값은 40nmol./mg protein이며 4×10⁻⁶M에서 최대의 절반정도 흡수되었다.

최대 흡수반응을 일으킨 상태에서 0.5mM EGTA만을 또는 0.5mM EGTA와 1~10mM Na⁺을 첨가시켰을 때 유리되는 칼슘은 41.97%~45.18%이며, 최대 uptake시킨 경우에는 11.43%~12.40%로 Na⁺첨가에 의한 Ca²⁺ 유리는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Na⁺과 K⁺의 비율이 Ca²⁺ 흡수 또는 유리에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Na⁺과 K⁺의 비율을 변화시켜 Ca²⁺을 흡수시킨 경우나, 일정량 흡수시킨 후 유리되는 경우를 보아도 모두 Ca²⁺ 유리에 영향을 주지 않았다.

위의 결과들로 미루어 볼 때 sarcoplasmic reticulum에서의 Ca²⁺ 유리에 Na⁺은 영향을 미치지 않는 것으로 보이며, 심장근 매 박동에 이용되는 Ca²⁺ 이온의 일부는 sarcoplasmic reticulum에서 Ca²⁺에 의하여 유리되는 Ca²⁺일 수도 있을 것으로 추정된다.

—ABSTRACT—

**The Ca²⁺-and Na⁺-Induced Ca²⁺ Release
from Isolated Cardiac Sarcoplasmic
Reticulum**

**Hae Won Kim, Myung Suk Kim,
and Chan Woong Park**

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

The Ca²⁺-and Na⁺-induced Ca²⁺ release was studied in sarcoplasmic reticulum isolated from porcine ventricles by milipore filtration method using radioisotope ⁴⁵Ca.

The isolated cardiac sarcoplasmic reticulum took up calcium maximally 40 to 50 min of incubation in the presence of 50mM inorganic phosphate. After reaching the maximal uptake, the spontaneous release of calcium was observed at high concentrations of CaCl₂ (above 150 μ M) in the medium, at the low concentrations of CaCl₂, however, the amount of calcium taken up was retained for prolonged period.

Unidirectional calcium efflux, calculated from measurements of influx of tracer ⁴⁵Ca at steady state calcium uptake, was stimulated by increasing external remaining calcium concentrations in the range of 1 to 20 μ M. The initial calcium efflux showed saturation kinetics with the apparent K_{Ca} of 7 μ M and a maximal calcium efflux of 180 nmol of calcium/mg protein/min.

In the absence of 50mM inorganic phosphate, maximal calcium binding by isolated cardiac sarcoplasmic reticulum in the free calcium concentrations of 5 \times 10⁻⁸ to 5 \times 10⁻⁵M was 40 nmol/mg protein. Calcium release was not observed by 1 to 10mM Na⁺ in the medium containing 0.5mM EGTA to prevent sarcoplasmic reticulum from rebinding the released Ca²⁺.

The changes in Na⁺/K⁺ ratio also did not influence the calcium binding or release.

From the experiment, the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum may be one of the calcium release mechanisms, and the released Ca²⁺

could initiate the cardiac contraction in the physiologic conditions. The Na⁺ itself and changes in Na⁺/K⁺ ratio might be no influence on calcium binding and release mechanism in cardiac sarcoplasmic reticulum.

REFERENCES

- Affolter, H., Chiesi, M., Dabrowska, R., and Carafoli, E.: *Calcium regulation in heart cells. The interaction of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum with troponin-bound calcium. Eur. J. Biochem.*, 67: 389-396, 1976.
- Baylor, S.M., and Oetliker, H.: *Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum. Nature*, 253:97-101, 1975.
- Blinks, J.R., Rüdel, R., and Taylor, S.R.: *Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: Detection with aequorin. J. Physiol.*, 277:291-323, 1978.
- Carafoli, E.: *Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. Biochem. Soc. Symp.*, 39:89-109, 1974.
- Carafoli, E.: *Mitochondria, Ca²⁺ transport and the regulation of heart contraction and metabolism. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:83-89, 1975.
- Chapman, R.A.: *Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 35: 1-52, 1979.
- Chimoskey, J.E., and Gergely, J.: *Effect of ions on sarcoplasmic reticulum fragments. Arch. Biochem. Biophys.*, 128:601-605, 1968.
- Crompton, M., Capano, M., and Carafoli, E.: *The sodium-induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. Eur. J. Biochem.*, 69: 453-462, 1976.
- Crompton, M., Künzi, M., and Carafoli, E.: *The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. Eur. J. Biochem.*, 79:549-558, 1977.
- Crompton, M., Moser, R., Lüdi, H., and Carafoli, E.: *The interrelations between the transport of*

- sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.*, 82:25-31, 1978.
- Dunnett, J., and Nayler, W.G.: Dependence of calcium efflux rate from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles on external calcium concentration. Effect of magnesium ion. *J. Physiol.*, 266:79P-80P, 1977.
- Ebashi, S.: Excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.*, 38:293-313, 1976.
- Ebashi, S., and Lipmann, F.: Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell. Biol.*, 14:389-400, 1962.
- Endo, M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.*, 57:71-108, 1977.
- Endo, M., Tanaka, M., and Ogawa, Y.: Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.*, 228:34-36, 1970.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Cir. Res.*, 31:293-307, 1972.
- 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, 1975a.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. *J. Physiol.*, 249:497-517, 1975b.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Cir. Res.*, 40:119-129, 1977a.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Variations of the membrane potential of the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle detected with a potential-sensitive dye. *J. Gen. Physiol.*, 70:6a, 1977b.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:491-522, 1978.
- Fabiato, A., and Fabiato, F.: Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.*, 41:473-484, 1979.
- Fawcett, D.W., and McNutt, N.S.: The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J. Cell. Biol.*, 42:1-45, 1969.
- Ford, L.E., and Podolsky, R.J.: Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions. *J. Physiol.*, 223:1-19, 1972a.
- Ford, L.E., and Podolsky, R.J.: Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres. *J. Physiol.*, 223:21-33, 1972b.
- 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.
- Harigaya, S., and Schwartz, A.: Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle. Membrane vesicles (relaxing system) and mitochondria. *Cir. Res.*, 25:781-794, 1969.
- Kasai, M., and Miyamoto, H.: Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. I. Release of calcium taken up upon using ATP. *J. Biochem.*, 79:1053-1066, 1976a.
- Kasai, M., and Miyamoto, H.: Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. II. Release of calcium incorporated without ATP. *J. Biochem.*, 79:1067-1076, 1976b.
- Katz, A.M., Repke, D.I., Dunnett, J., and Hasselbach, W.: Dependence of calcium permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *J. Biol. Chem.*, 252:1950-1956, 1977a.
- Katz, A.M., Repke, D.I., Fudyma, G., and Shigekawa, M.: Control of calcium efflux from sarcoplasmic reticulum vesicle by external calcium. *J. Biol. Chem.*, 252:4210-4214, 1977b.
- 김명석 : Na⁺ 및 K⁺에 의한 심장근 Mitochondria에서의 Ca[#]유리 작용. 대한약리학잡지 14:1-11, 1978.
- 김용식, 박찬웅, 김명석 : 심장근 Mitochondria에서의 Ca[#] 유리에 대한 Na⁺의 영향. 대한약리학잡지 17:1-8, 1981.
- Kirchberger, M.A., Wong, D., and Katz, A.M.: Ca[#]-dependent calcium efflux from cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Clin. Res.*, 25:455A, 1977.

- Kirchberger, M.A., and Wong, D.: *Calcium efflux from isolated cardiac sarcoplasmic reticulum*. *J. Biol. Chem.*, **253**:6941-6945, 1978.
- Kirchberger, M.A., and Wong, D.: *Calcium efflux from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles*. *Adv. Myocardiol.*, **1**:179-187, 1980.
- 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.
- Laguens, R.: *Morphometric study of myocardial mitochondria in the rat*. *J. Cell. Biol.*, **48**:673-676, 1971.
- Langer, G.A.: *Events at the cardiac sarcolemma: localization and movement of contractile-dependent calcium*. *Fed. Proc.*, **35**:1274-1278, 1976.
- Lamers, J.M.J., and Stinis, J.T.: *An electrogenic Na⁺/Ca²⁺ antiporter in addition to the Ca²⁺ pump in cardiac sarcolemma*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **640**:521-534, 1981.
- Lee, K.S., and Choi, S.J.: *Effects of the cardiac glycosides on the Ca²⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**:114-120, 1966.
- Lee, K.S., and Klaus, W.: *The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides*. *Pharmacol. Rev.*, **23**:194-261, 1971.
- Legato, M.J., and Langer, G.A.: *The subcellular localization of calcium ion in mammalian myocardium*. *J. Cell. Biol.*, **41**:401-423, 1969.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.
- Miyamoto, H. and Kasai, M.: *Reexamination of electrical stimulation on sarcoplasmic reticulum fragments in vitro*. *J. Gen. Physiol.*, **62**:773-786, 1973.
- Page, E., and McCallister, L.P.: *Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts*. *Am. J. Cardiol.*, **31**:172-181, 1973.
- Reuter, H.: *Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Mechanisms and physiological significance*. *Cir. Res.*, **34**:599-605, 1974.
- Ringer, S.: *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, 1883.
- Sandow, A.: *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. *Pharmacol. Rev.*, **17**:265-320, 1965.
- Solaro, R.J., Wise, R.M., Shiner, J.S., and Briggs, F.N.: *Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation*. *Cir. Res.*, **34**:525-530, 1974.
- Van Winkle, W.B., and Schwartz, A.: *Ions and inotropy*. *Ann. Rev. Physiol.*, **38**:247-272, 1976.
- Will, H., Blanck, J., Smettan, G., and Wollenberger, A.: *A quench-flow kinetic investigation of calcium ion accumulation by isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. Dependence of initial velocity on free calcium ion concentration and influence of preincubation with a protein kinase, MgATP, and cyclic AMP*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **449**:295-303, 1976.