

Propranolol이 심근 Mitochondria의 Ca^{++} 조절 작용에 미치는 효과에 관한 연구

Effect of Propranolol on the Ca^{++} -regulation of Cardiac Mitochondria

서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 약리학교실* 및 중앙대학교 의과대학 약리학교실**

최수승·서경필·신상구*·김명석*·박찬웅*·이광수**

서론

부정맥 및 고혈압 치료제로서 임상적으로 사용되고 있는 propranolol은 전기 생리학적 분류, 제 2군에 속하는 β -아드레날린 수용체 차단성 항부정맥제로서, 현재까지 알려진 그 항부정맥 효과의 작용기전은 주로 β -아드레날린 수용체 차단효과와 심근 세포막의 흥분 억제 효과에 의한 것으로 추정하고 있다(Tsien, 1974; Hauswirth & Singh, 1978).

β -아드레날린 수용체 차단제 중 비교적 심근에만 선택적으로 작용하는 acebutolol, practolol 등과의 비교 실험에서, propranolol은 고농도에서 β -아드레날린 수용체 차단효과와는 무관한 심근 수축력 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며(Dhalla & Lee, 1976; Noack 1981), 이러한 심근 억제효과는 심근 세포내 Ca^{++} 조절기구에 미치는 효과에 기인할 것으로 추정하고 있다.

근 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에는 세포막, sarcoplasmic reticulum, mitochondria 등이 관여하는 것으로 인정되고 있으며, 이중 sarcoplasmic reticulum이 근 수축과 이완시 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 주 역할을 할 것으로 추정하고 있으나(Ebashi 1976; Fabiato & Fabiato, 1979), 심근 세포에는 sarcoplasmic reticulum의 양이 적으며 체계적으로 배열되어 있지 않고(Page & McCallister, 1973), 최근 Carafoli(1978)에 의해 심근에 풍부한 mitochondria에서의 Na^{+}/Ca^{++} 교환작용이 알려져 심근에서는 심근 흥분-수축 이완 과정에서 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절에 mitochondria도 큰 역할을 할 것으로 추정되고 있다.

또한 심장의 여러 형태의 부정맥 발생과정에서 Ca^{++} 내향전류가 관여되며(Aronson & Cranefield, 1973), 세포내 Ca^{++} 농도의 증가는 세포막의 다른 이온의 전도도에 영향을 주어 부정맥 발생이 쉬운(proarrhythmic) 상태가 된다고 추정하고 있어(Isenberg & Trantwein, 1975; Hauswirth & Singh, 1978) 세포내 유리 Ca^{++} 농도의 변화는 근 수축 이완과정 뿐 아니라 근 세포의 전기 생리학적 변화도 유발할 것으로 믿어진다.

따라서 본 연구에서는 심근 세포내 유리 Ca^{++} 농도 조절기구로 알려진 mitochondria의 Ca^{++} 조절 작용에 미치는 propranolol의 효과를 관찰함으로써 심근 세포내 Ca^{++} 농도 변화의 관점에서 propranolol의 항부정맥 효과 및 심근 억제작용의 기전을 검토하고자 하였다.

실험 방법

1. 심근 mitochondria의 추출

돼지 심실근에서 mitochondria의 추출은 Sulakhe and Dhalla (1971)의 방법에 준하여 추출하였다. 적출 심실근을 냉각시킨 10배 용량의 균질용액(250mM sucrose, 10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA)에 넣고 잘게 썰은 다음 polytron 조직분쇄기(Brinkman, Model PT-20)로 rheostat 5에서 15초 동안 균질화한 후 1,000g에서 20분간 냉동원심분리하고 상등액을 10,000g에서 20분간 냉동 원심분리하여 얻은 잔사를 4배 용량의 균질용액에 부유시켜 10,000g에서 15분 동안 다시 냉동 원심분리하여 세척하였으며, 이후 이러한 세척을 2회 반복하였고 이때 세척용액은 EDTA를 포함하지 않은 균질용액을 사용하였다. 최종 얻은 mitochondria는 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4 용액에 단백질농도가 15~20mg/ml되게 부유시켜 실험에 사용하였다.

모든 mitochondria의 추출조작은 0~4°C에서 시행하

† 접수일자: 1983. 12. 21.

* 본 연구는 1982년도 산학재단 연구비의 보조로 이루어졌음.

였으며, 단백질 농도는 Lowry(1951)의 방법으로 측정하였다.

2. Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 및 유리의 측정

Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 및 유리는 22mCi/mg의 활성도를 지니는 Amersham UK제의 방사성 동위원소 ⁴⁵Ca²⁺를 사용하여 Lee and Choi(1966)의 millipore filter (HAWP 13mm, pore size 0.45 micron)를 사용하여 측정하였다. Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수반응은 25°C의 항온 진탕 수욕조에서 표준반응액(250mM sucrose, 10mM Tris-HCl pH. 7.4)에 mitochondria를 1mg/ml 농도가 되도록 첨가 시행하였고, 에너지원으로는 호흡기질인 5mM의 Tris-succinate를 첨가하였으며 반응액내의 Ca²⁺ 농도는 각 실험조건에 따라 적절하게 조절하였으며 동위원소 ⁴⁵Ca²⁺는 0.5μCi/ml로 첨가하였다.

Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 및 유리량의 측정은 0.25ml의 반응액을 millipore filter를 통과시켜 얻은 여액 0.1 ml를 10ml의 liquid scintillation cocktail (dioxane base로 1/당 4gm PPO, 0.242gm POPOP, 60gm naphthalene, 100ml methanol, 20ml ethylene glycol을 함유)에 첨가하여 liquid scintillation spectrometer (Packard, Tris-Carb, Model 3395)로 방사능을 측정하여 mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 및 유리량을 계산하였다.

Propranolol의 mitochondria Ca²⁺ 흡수 및 유리에 미치는 효과는 실험조건에 따라 Ca²⁺ 흡수반응 개시전 또는 반응 중 3×10⁻⁶M 내지 1×10⁻³M의 propranolol을 첨가하여 대조실험과 동일한 방법으로 시행하였다.

i) Mitochondria의 Ca²⁺ 운반 및 dinitrophenol에 의한 Ca²⁺의 유리; 15μM의 Ca²⁺, 5mM의 succinate를 함유하는 5ml 표준 반응액에 5mg의 mitochondria를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응 15초 후부터 경시적으로 0.25ml의 반응액을 채취하여 millipore filter로 여과하였으며, 반응 개시 후 5분에 Ca²⁺ 흡수를 차단하고 mitochondria 외면에 에너지 비의존성으로 결합된 Ca²⁺를 제거키 위해(Reed & Bygrave, 1974) 1.2 mM의 EGTA-tris를 첨가하였고 이후 30초 후에 H⁺-ionophore인 50μM의 2,4-dinitrophenol을 처리하여 흡수된 Ca²⁺의 유리를 유도하였다.

ii) Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수; Mitochondria의 Ca²⁺ 운반은 mitochondria의 내막을 통한 Ca²⁺ 흡수와 에너지 비의존성의 외면 결합으로 구분될 수 있다(Reed & Bygrave, 1974; 1975). 따라서, 내막을 통한 Ca²⁺ 흡수량을 정확히 분석하기 위해 mitochondria의 외막은 자유로이 투과하나 내막을 통과할 수 없는 Ca²⁺-chelator인 EGTA와 mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 차단제

로 알려진 ruthenium red를 이용하였다(Noack, 1981).

130μM Ca²⁺를 함유하는 반응조건에서 30초 이후 경시적으로 채취한 0.25ml의 반응액을 0.125ml의 6mM EGTA, 90μM ruthenium red액과 즉시 혼합하여 더 이상의 Ca²⁺ 흡수를 막고 mitochondria 외면에 결합된 Ca²⁺를 제거한 후 10초 후 millipore filter로 여과하여 mitochondria의 Ca²⁺ 흡수량을 측정하였다.

iii) Na⁺에 의한 mitochondria Ca²⁺의 유리; Na⁺에 의한 mitochondria내 Ca²⁺의 유리와 이에 대한 propranolol의 효과를 관찰하기 위해 15~25μM의 Ca²⁺를 함유하는 반응 조건에서 Ca²⁺ 흡수 반응개시 후 4분에 propranolol을 지시 농도가 되게 첨가한 후 5분에 1.2 mM EGTA-tris 첨가로 흡수반응을 정지시켰다. 이후 30초 후 Na⁺ 10mM을 첨가하여 흡수된 Ca²⁺의 유리를 유도하였다.

Na⁺에 의한 Ca²⁺의 유리속도(nmole/mg/min)는, 최초 1분간은 직선상의 Ca²⁺ 유리를 보여 Na⁺ 첨가후 최초 30초 및 1분간의 실험성적으로 부터 구하여 이들의 평균치를 취하였다.

iv) Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수에 대한 동력학적 분석; 반응액내의 유리 Ca²⁺ 농도의 변화에 따른 mitochondria의 초기 Ca²⁺ 흡수속도를 측정하기 위해 Ca²⁺ 흡수반응 표준액에 2.5μM의 rotenone을 첨가하고 Ca²⁺의 농도는 실험계획에 따라 첨가하였으며 이때 반응액에 존재하는 정확한 유리 Ca²⁺양을 측정키 위해 Ca²⁺ 흡수반응 개시전 0.25ml씩 두개의 시료를 채취하여 한 채취액은 즉시 millipore filter로 여과하여 여액의 방사능을 측정하고 나머지 또 한 시료는 여과하지 않은 전체 시료의 방사능을 측정하여 반응액내 유리 Ca²⁺ 양을 계산하였다.

Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수 반응은 5mM의 Tris-succinate의 첨가 후 10초 및 20초에 0.25ml의 반응액을 채취하여 2mM EGTA, 30μM ruthenium red quenching 방법을 사용하여 초당 흡수되는 양을 산출하여 이들의 평균치를 초기 Ca²⁺ 흡수속도(nmole/mg/sec)로 하였다.

v) Na⁺에 의한 mitochondria의 Ca²⁺ 유리에 대한 동력학적 분석; Na⁺ 농도 변화에 따르는 mitochondria의 Ca²⁺ 유리속도의 측정도 iii)과 동일한 방법으로 Ca²⁺ 흡수를 유도하고 5분후에 1.2mM EGTA-tris 처리 후 Na⁺ 각 농도를 첨가하여 30초 및 1분 동안 유리되는 Ca²⁺ 양으로 부터 초기 Ca²⁺ 유리속도(nmole/mg/min)를 산출하였다.

실험 결과

1. Mitochondria의 Ca²⁺ 운반 및 dinitrophenol

에 의한 Ca²⁺ 유리에 미치는 propranolol의 효과

15μM Ca²⁺과 5mM Tris-succinate 존재하에서 mitochondria의 Ca²⁺ 운반은 대단히 활발하여 3분 후 반응액 내 Ca²⁺의 90% 이상이 mitochondria에 존재하였으며 propranolol 첨가시에는 용량 의존적으로 Ca²⁺ 운반이 감소하여 1×10⁻³M의 농도에서는 현저한 감소를 나타내었다. 반응 5분 후 1.2mM EGTA 첨가로 Ca²⁺ 흡수를 억제하고 mitochondria 외면에 결합된 Ca²⁺을 유리시킨 바 외면의 에너지 비의존성 Ca²⁺ 결합은 10% 내외였으며 EGTA만 처리한 경우 흡수된 Ca²⁺의 유리는 분당 0.3nmole 이하였다. H⁺-ionophore인 50μM dinitrophenol 처리로 succinate 첨가에 의해 형성된 mitochondria의 막전압을 제거시킨 바 mitochondria에 흡수된 Ca²⁺은 신속히 유리되었으며 대조시 초기 30초 동안 4.80 nmole의 Ca²⁺ 유리를 보였다.

Propranolol 첨가에 따른 흡수된 Ca²⁺의 유리속도는

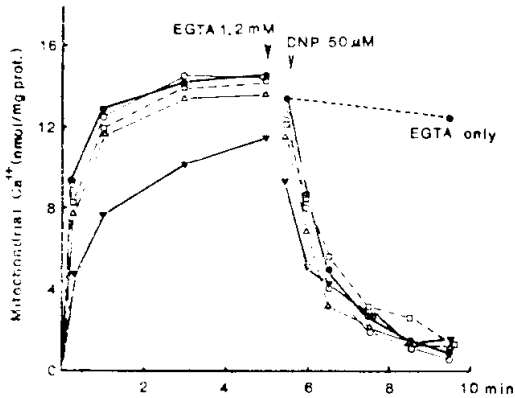


Fig. 1. Effect of propranolol on Ca²⁺ transport and dinitrophenol induced Ca²⁺ release of porcine cardiac mitochondria. Mitochondria (1mg/ml) were incubated at 25°C in a 5ml medium containing 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 5mM Tris-succinate and 15μM Ca²⁺. with or without propranolol. 0.25ml of aliquote was taken and used for determination of mitochondrial Ca²⁺ transport and release as described in the Method. After 5 min incubation, EGTA-tris (final concentration; 1.2mM) was added to chelate externally bound Ca²⁺ and block the further Ca²⁺-uptake. 30 sec later, Ca²⁺ release was observed by adding 50μM dinitrophenol; Control (●), Propranolol, 3×10⁻⁵ (○), 1×10⁻⁴ (□), 3×10⁻⁴ (△), 1×10⁻³ (▲).

1×10⁻³M의 고농도에서 까지 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

2. Mitochondria의 Ca²⁺ 흡수에 미치는 propranolol의 효과

상기의 실험결과에서 보인 propranolol의 mitochondria의 Ca²⁺ 운반 억제효과를 에너지 의존성의 Ca²⁺ 흡수만을 관찰하기 위해 2mM EGTA, 30μM ruthenium red quenching법을 사용한 바 대조시 mitochondria는 130μM의 Ca²⁺ 존재하에서 반응 5분 후 50.30 nmole/mg protein의 최대 Ca²⁺ 흡수율을 보였으며 이후 흡수했던 Ca²⁺은 일부를 점차 유리하였다.

Propranolol을 첨가한 경우에 있어서 mitochondria의 Ca²⁺ 흡수율 및 최대흡수는 용량 의존적인 감소를 보였으며 1×10⁻³M 처리의 경우 20.52 nmole/mg protein의 최대 Ca²⁺ 흡수율을 보였다(Fig. 2).

3. Na⁺에 의한 Mitochondria Ca²⁺ 유리에 미치는 propranolol의 효과

Na⁺에 의한 mitochondria 내막을 통해 흡수된 Ca²⁺의 유리를 관찰하고자 15~25μM의 Ca²⁺ 존재하에서 5분 동안 흡수시키고 1.2mM EGTA를 처리 후 10mM Na⁺을 첨가하였을 때 mitochondria의 Ca²⁺ 유리속도는 대조시 평균 분당 3.60 nmole/mg이었으며 반응 4분에 propranolol을 첨가한 경우 Ca²⁺의 유리는 용량 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리작용에 대한 propranolol의 억제 정도는 Fig. 4에서와 같으며 Ca²⁺ 흡수작용을 억제하는 농도보다 현저히 낮은 3×10⁻⁶M 부터 유의한 억제를 보였으며 3×10⁻⁵M에서 64%, 3×10⁻⁴M에서 88%

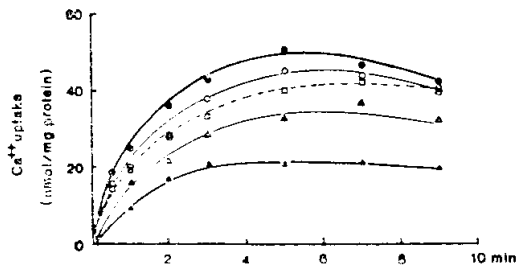


Fig. 2. Effect of propranolol on the Ca²⁺-uptake of cardiac mitochondria. Experimental conditions were same as in Fig. 1, except that 130μM Ca²⁺ was added in the reaction medium. Each aliquote (0.25ml) at different intervals of incubation was rapidly mixed with 30μM ruthenium red and 2mM EGTA-tris to terminate Ca²⁺ uptake, filtered 10 sec after the mixing and assayed for radioactivity.; Control (●), Propranolol, 3×10⁻⁵ (○), 1×10⁻⁴ (□), 3×10⁻⁴(△), 1×10⁻³ (▲).

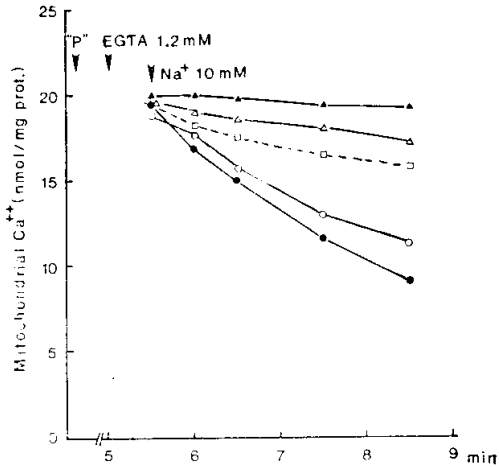


Fig. 3. Effect of propranolol on the Na⁺ induced Ca[#]-efflux from cardiac mitochondria. The mitochondria (1mg/ml) were incubated in the same conditions as in Fig. 1, except that the reaction medium contained 25 μ M Ca[#]. After 4 min incubation, varying concentrations of propranolol were added (marked "P") and followed by 1.2mM EGTA-tris to chelate externally bound Ca[#]. Ca[#]-efflux was observed by adding 10mM NaCl; Control (●), Propranolol, 1 \times 10⁻⁵M (○), 3 \times 10⁻⁵M (□), 1 \times 10⁻⁴M (△), 3 \times 10⁻⁴M (▲).

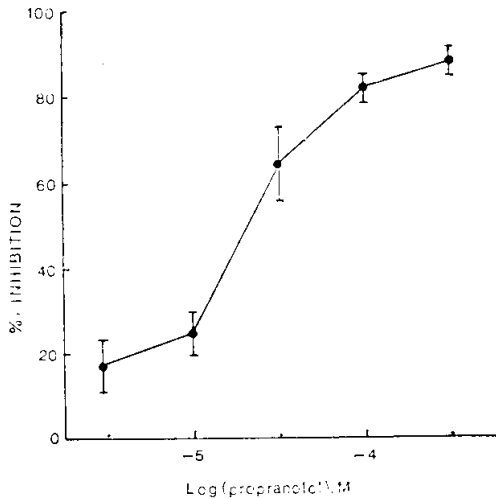


Fig. 4. The inhibition of Na⁺ induced Ca[#]-efflux from cardiac mitochondria by propranolol. Experimental conditions were exactly same as in Fig. 3, except that 15~25 μ M Ca[#] were contained in the reaction medium. Ca[#]-efflux rate (nmol mg⁻¹ min⁻¹) was obtained from the mean Ca[#] release rate for the periods of 30 and 60 sec after addition of 10mM NaCl. Ca[#]-efflux rate in the absence of propranolol was 3.60 \pm 0.25 nmol \cdot mg⁻¹ \cdot min⁻¹. Each point represents Mean \pm S.E of 5 experiments.

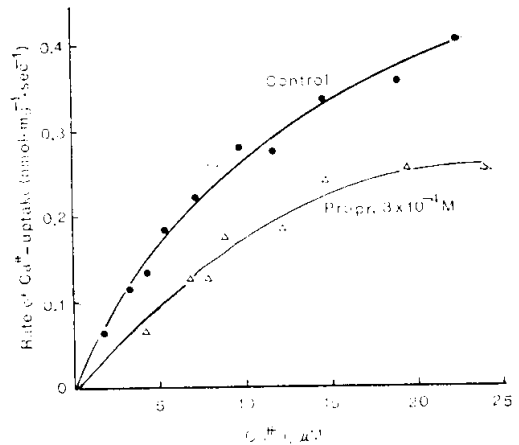


Fig. 5. Effect of propranolol on the rate of cardiac-mitochondrial Ca[#]-uptake in the presence of various extramitochondrial Ca[#] concentrations. Incubation medium contained, in a total volume of 3ml, 250mM sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 μ M rotenone and 3mg mitochondrial protein. Ca[#] uptake was initiated by adding 5mM Tris-succinate. Uptake was terminated by using the quenching technique with 30 μ M ruthenium red and 2mM EGTA-tris. Data are the means of the initial rates obtained from 10 and 20 sec periods.

의 억제율 보이는 sigmoid 양상의 용량-반응 곡선을 나타내었다.

4. Propranolol의 mitochondria Ca[#] 흡수 억제 효과의 동력학적 분석

실험방법에서 언급한 바와 같이 반응액내의 유리 Ca[#] 농도를 측정하고, 반응액내 유리 Ca[#] 농도 변화에 따른 초기 Ca[#] 흡수 속도를 측정할 결과, 초기 Ca[#] 흡수 속도 곡선은 유리 Ca[#] 농도 증가에 따라 Michaelis-Menten 방정식에 따르는 양상을 보였고 (Fig. 5), 대조시 최대 Ca[#] 흡수속도(V_{max})는 초당 0.65nmole/mg이었고 Km치(최대 Ca[#] 흡수속도의 50% 흡수속도를 보이는 Ca[#]의 농도)는 11.67 μ M이었다.

한편 propranolol이 첨가된 상태에서의 Km치는 변화가 없고 최대 Ca[#] 흡수속도만이 감소하는 비경쟁적인 억제양상을 보였으며 Ki치(Ca[#] 흡수속도를 50% 억제하는 propranolol의 농도)는 6.21 \times 10⁻⁴M이었다 (Fig. 6).

5. Propranolol의 Na⁺에 의한 mitochondria Ca[#] 유리 억제효과의 동력학적 분석

15~25 μ M의 Ca[#] 존재하에서 5분간 Ca[#]을 흡수시킨

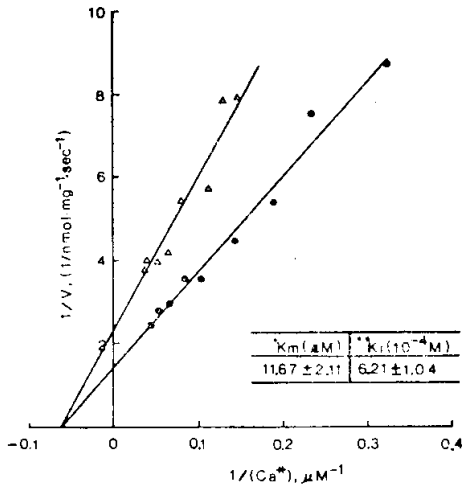


Fig. 6. A double reciprocal plot of Ca²⁺-uptake by cardiac mitochondria taking the data of Fig. 5. Symbols; Control (●), Propranolol, 3 × 10⁻⁵M (△).

*Ca²⁺ concentration producing half-maximal uptake velocity, Mean ± S.E. of 5 experiments.

**Propranolol concentration for half-maximal inhibition of Ca²⁺ uptake velocity, Mean ± S.E. of 5 experiments.

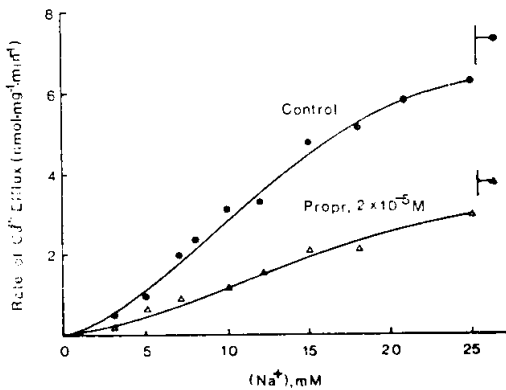


Fig. 7. Effect of propranolol on the Na⁺ induced Ca²⁺-efflux rate in cardiac mitochondria. The mitochondria were incubated in same conditions as in Fig. 4. After 5 min preloading period, 1.2mM EGTA-tris was added. 30 sec later, Ca²⁺-efflux was observed by adding varying concentrations of Na⁺. Na⁺ induced Ca²⁺-efflux rates are the mean values obtained from 30 and 60 sec data.

후 Na⁺ 각 농도 첨가에 따라 유리되는 Ca²⁺의 유리량으로 Ca²⁺ 유리속도를 측정한다, 대조시 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리속도는 최대 분당 7.43 nmole/mg이었고 Ca²⁺

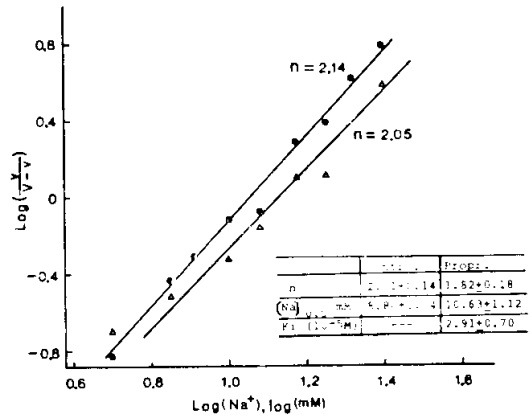


Fig. 8. A Hill plot of Na⁺ induced Ca²⁺-efflux rate in cardiac mitochondria taking the data of Fig. 7, where v is the velocity of Ca²⁺-efflux (nmol·mg⁻¹·min⁻¹) and V is the maximum velocity of efflux at saturating Na⁺ concentration. Symbols; Control (●), Propranolol, 2 × 10⁻⁵M (△). The values in square are the Mean ± S.E. obtained from 5 different preparations.

유리속도는 “S”자형 곡선의 Na⁺ 농도 의존성을 보였다 (Fig. 7). 이러한 결과는 mitochondria 내막에 존재하는 Na⁺-Ca²⁺ 교환 carrier의 Na⁺ 결합부는 복합체로 존재하거나 Na⁺ 결합시 결합부 간에 협동성이 존재하는 결과로 보므로 이를 Hill방정식에 적용시켰다. 이때 Hill plot의 기울기는 2.01이었고 최대 Ca²⁺ 유리속도의 50%의 Ca²⁺ 유리속도를 보이는 Na⁺의 농도([Na⁺]_{0.5})는 8.80mM이었다(Fig. 8). 한편 propranolol 처리한 경우에 있어서도 “S”자형 곡선의 Na⁺ 농도 의존도를 보이며(Fig. 7) 최대 Ca²⁺ 유리속도는 감소되었으나, Hill plot의 기울기는 1.82, [Na]_{0.5}는 10.63mM로 대조시와 유의한 차이를 보이지 않는 비경쟁적인 억제 양상을 나타내었으며 Ki치는 2.91 × 10⁻⁵M이었다(Fig. 8).

고 찰

Ca²⁺은 세포내 정보 전달체로서 생체세포의 여러가지 기능 조절에 관여하고 있으며, 심장근에서는 심근 수축—이완 기전의 정보전달체로서 뿐만아니라 세포막 이온전도와 전기생리학적 변화에도 중요한 의의를 지닌 것으로 인정되고 있다.

심근에서의 부정맥 발생기전에 대한 연구는 그간 많은 연구가 진행되어 왔으며 특히 전기생리학적인 견지에서 많은 연구로 심부정맥의 발생기전과 관련한 세

포막 이온전도의 변화에 관련하여 설명하려는 시도가 많은 진전을 이루었다.

심근 부정맥에 있어서 저포타슘혈증, 고칼슘혈증, 저산소증 및 digitalis 배당체의 독작용 출현시에 막전압의 진동성 전압변동(oscillatory activity)이 나타나며 이러한 막전압의 진동성 전압변동은 세포막을 통한 완만 내향성전류(slow inward current) 즉 Ca⁺ 전류가 주원인으로 간주되어 상기 조건에서 나타나는 부정맥의 발생기전에 Ca⁺이 관여하는 것으로 추정되고 있다(Aronson & Cranefield, 1973; Hauswirth & Singh, 1978). 또한 Isenberg 등(1975)은 양의 Purkinje 섬유에서 세포내 Ca⁺ 농도를 증가시킬 때 세포내 Ca⁺ 농도의 증가는 세포막 K⁺ 투과성의 변화를 유도하여 빠른 세포막 재분극으로 활동전압 기간을 짧게하여 부정맥 발생조건을 유도하며, 이러한 현상은 타 부정맥 유발조건인 digitalis 또는 adrenaline 투여시 등에서도 나타나 심근 세포내 Ca⁺ 농도의 증가가 부정맥 생성에 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있다(Kass & Tsien, 1976; Hauswirth & Singh, 1978).

한편 심근 세포내 유리 Ca⁺은 심근 수축기전의 세포막 흥분—수축 연결과정(excitation-contraction coupling)에서 절대적 중심적 역할을 하여, 이완시 10⁻⁸~10⁻⁷이던 세포내 유리 Ca⁺ 농도가 근 세포막 탈분극에 따른 수축이 일어나기 시작할 때에는 10⁻⁵M로 증가하여 근 단백질중 Ca⁺에 민감한 troponin C에 결합함으로써 수축단백인 actin과 myosin의 상호 연결을 가능케 하여 수축을 일으키며, 이 Ca⁺이 다시 troponin C로부터 떨어져나와 세포 내부 Ca⁺저장소에 축적되거나, 세포외로 유리되어 나가 Ca⁺ 농도가 낮아짐으로써 심근 이완이 일어난다고 알려져 있다(Ebashi, 1976; Fozzard, 1977).

이와 같이 심근 부정맥 발생기전 및 근 수축—이완에 관여하는 세포내 유리 Ca⁺ 농도는 근 세포막과 세포내 기구들인 sarcoplasmic reticulum, mitochondria 및 기타 Ca⁺ 결합 단백질 등의 복합적 작용에 의해 조절될 것으로 받아들여지고 있으며 이중 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria에 의한 조절이 많은 학자들에게 특히 중요시 되고 있다(Ebashi, 1976; Carafoli & Crompton, 1978; Fabiato & Fabiato., 1979).

Propranolol은 전기생리학적으로 제 2군에 속하는 β -아드레날린 수용체 차단성 항부정맥제으로써, 항부정맥 효과의 작용기전으로는 β -아드레날린 수용체 차단효과에 의해 나타나는 세포막에서의 제 4기 탈분극(phase 4 depolarization) 시기에 외향성 포타슘 전류(iK₂) 억제에 주 작용이며 더 높은 농도에서 나타나는 내향성 소듐전

류(iNa)의 억제효과가 그 항부정맥 작용기전으로 추정되고 있다(Tsien, 1974; Hauswirth & Singh, 1978). 한편 propranolol은 고농도에서 β -아드레날린 수용체 차단효과와는 무관한 심근 수축력 억제효과를 보이며(Dhalla & Lee, 1976; Noack 1981) 이는 아마도 심근 세포내 Ca⁺ 조절기구에 대한 효과의 이차적인 결과라 추정하고 있다(Dhalla et al., 1977; Noack 1981).

심근 mitochondria는 호흡 체인의 기질에 의해서 형성되는 proton-motive force($\Delta\psi$)의 형성으로 mitochondria 내막의 Ca⁺-carrier를 통하여 Ca⁺ 흡수가 일어나며(Heaton & Nicolls, 1976; Crompton & Heid, 1978), 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 Ca⁺ 흡수 carrier는 ruthenium red에 의해 억제된다(Carafoli, 1980). 이러한 mitochondria의 Ca⁺ 흡수작용에 의한 세포내 Ca⁺농도 조절기전 이외에도 생리적 세포내 중요이온인 Na⁺에 의해 mitochondria 내의 Ca⁺이 유리되며 이는 mitochondria 내막의 Ca⁺ 흡수 carrier와는 다른 Na⁺-Ca⁺ 교환을 촉매하는 carrier에 의한 결과로 생각되어 Crompton 등(1978)은 mitochondria는 막전압 형성을 원동력으로 하는 Ca⁺ 흡수와 세포내 Na⁺에 의한 Ca⁺ 유리가 세포내 유리 Ca⁺ 농도 조절에 중요역할을 하리라 시사하고 있다.

본 실험에서는 mitochondria의 Ca⁺ 흡수량을 정확히 측정하기 위해 Ca⁺ 흡수과정을 차단하고 생리적 의의가 적은 mitochondria의 외면에 에너지 비의존성으로 결합하는 Ca⁺을 유리시키기 위해 2mM EGTA와 30 μ M ruthenium red를 처리하였다. 그러나 EGTA의 사용시 문젯점은 반응액내의 Ca⁺을 zero 상태로 만듦으로써 mitochondria 내막을 사이에 두고 Ca⁺의 농도경사를 크게 함으로써 피동적인 Ca⁺의 누출을 추측할 수 있으나 대조 실험결과 소량만이 누출된 것은 mitochondria 내부에 형성된 막전압에 의한 것으로 추측된다. Mitochondria의 Ca⁺ 흡수에 대한 propranolol의 효과의 실험 결과는 대조시 최대 Ca⁺ 흡수율의 50%를 나타내는 Ca⁺의 농도는 11.67 μ M, 최대 Ca⁺ 흡수속도는 초당 0.65nmole/mg으로 Crompton 등(1976b)의 결과와 유사하였으며, propranolol은 상당히 고농도(Ki; 6.21 $\times 10^{-4}$ M)에서 최대 Ca⁺ 흡수 및 Ca⁺ 흡수율을 억제하였고, 이러한 억제양상은 Ca⁺과 비경쟁적으로 작용하는 결과를 보였다. 본 실험결과만을 가지고 mitochondria의 Ca⁺ 흡수과정 중 propranolol의 작용부위는 알 수 없으나 이러한 억제현상은 Ca⁺ 축적의 억제로 심근 수축 이완에 이용가능한 세포내 Ca⁺양을 줄이는 결과로 생각되었다(Sealles & McIntosh, 1968).

H⁺-ionophore인 dinitrophenol 처리는 H⁺가 mitoc-

hondria의 내막을 자유로히 통과케 함으로써 mitochondria의 정상 호흡기전에 따라 형성된 막전압을 제거하게 된다. 따라서 막전압을 원동력으로 하여 흡수된 Ca²⁺이 결과적으로 유리되게 된다. 이러한 잘 알려진 dinitrophenol의 Ca²⁺ 유리기전에 비하여 Na⁺에 의한 Ca²⁺ 유리기전에 대해서는 아직도 논란이 많다. 본 실험에서 Na⁺에 의한 mitochondria 내부에 흡수된 Ca²⁺의 유리는 현저하였으며, Na⁺과 mitochondria 내부의 Ca²⁺의 교환은 Ca²⁺의 유리속도 곡선이 "S"자형의 Na⁺ 농도 의존성을 보여 Hill 방정식에 적용시킨 바 Hill coefficient는 2에 가까워 매 Na⁺-Ca²⁺ 교환시마다 1개 Ca²⁺에 대하여 2개 이상의 Na⁺이 관여할 것으로 사료되었다. 이러한 관점에서 Crompton 등(1976a)은 ruthenium red로 Ca²⁺ 흡수를 차단시 Hill coefficient는 3에 가까워 Na⁺-Ca²⁺의 교환기전은 electrogenic 교환일 것으로 추정하였으나, 이들의 실험조건은 mitochondria 외면 결합 Ca²⁺의 유리가 가미되는 조건인 문제점이 있다. 또한 Carafoli (1980)의 succinate 첨가에 의해 mitochondria에 Ca²⁺ 흡수를 시킨 후 Na⁺ 첨가에 의해 Ca²⁺ 유리시 mitochondria의 막전압이 변하지 않는다는 보고로 미루어 볼 때 mitochondria 내막에서의 Na⁺-Ca²⁺ 교환은 electro-neutral한 즉 전반적으로 막 내외부 하전의 변화를 초래치 않는 2Na⁺-1Ca²⁺의 교환이 일어난 것으로 추정된다. 대조시의 50%의 최대 Ca²⁺ 유리를 나타내는 Na⁺농도([Na⁺]_{0.5})가 8.80mM로써 이는 Crompton 등(1976a; 1977)의 결과와 유사하였고, Ca²⁺ 유리속도가 [Na⁺]²에 비례함은 심실근 세포내 유리 Na⁺의 농도가 6~7mM(Lee & Fozzard, 1975)이라는 점을 감안할 때 세포내 Na⁺ 농도의 적은 변화도 mitochondria와 원형질간의 Ca²⁺ 분포를 큰 폭으로 조절할 것으로 사료된다.

Propranolol은 dinitrophenol 처치에 따른 Ca²⁺의 유리는 억제치 않으나 electro-neutral한 교환으로 사료되는 Na⁺에 의한 Ca²⁺의 유리는 억제를 보였고, 이는 mitochondria 내막을 통한 Ca²⁺의 유리는 적어도 전혀 다른 두 가지 이상의 Ca²⁺ 유리 channel이 존재하고 그 운반기전 또한 상이할 것으로 추정된다. Na⁺-Ca²⁺ 교환의 propranolol에 의한 억제는 Ca²⁺ 흡수속도를 억제하는 농도에 비해 훨씬 낮은 농도에서 부터 나타났으며, 그 억제 양상은 Na⁺과 비경쟁적인 양상의 억제를 보였다. 현재로서는 mitochondria의 Na⁺-Ca²⁺ 교환기전이 심근 수축시 세포내 Ca²⁺ 동원 인자로서의 중요성이 완전히 확립되어 있지는 않으나, propranolol의 mitochondria의 Na⁺-Ca²⁺ 교환의 억제는 심근 수축시 mitochondria에서의 Ca²⁺ 유리량을 낮추어, 심근 수축억제

효과가 나타나리라 사료된다. 또한 Na⁺-Ca²⁺ 교환속도의 50% 억제 농도가 29μM이었다. 이는 심근 β-수용체 차단효과를 나타내는 농도(100~300ng/ml) 보다는 높으나 심실성 부정맥 치료에 요구되는 propranolol 고용량 투여시 항 부정맥 기전으로 관여할 것으로 추정되는(Hauswirth & Singh, 1978) 내향성 소듐전류를 억제하는 극소마취효과 출현농도(10μg/ml)보다 낮은 농도임을 감안할 때, propranolol의 mitochondria에 대한 Na⁺-Ca²⁺ 교환억제에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도 저하는 세포막에서의 활동전압 제2,3기에 관여하는 외향성 포타슘 전류의 변화로 항 부정맥 효과가 나타날 가능성을 지니며, 특히 세포내 Na⁺ 또는 Ca²⁺ 농도의 증가를 동반하여 나타날 수 있는 부정맥 발생조건에서는 더욱이 가능한 항 부정맥 기전으로 추측된다.

이상의 실험결과로 보아 심근 mitochondria의 Ca²⁺ 조절작용에 대한 propranolol의 억제작용은 생리적 심근 세포내 Ca²⁺ homeostasis에 영향을 미쳐 propranolol 고농도 처치시에 나타날 수 있는 심근 수축력 억제 및 항 부정맥 효과의 작용기전의 일부로써 관여할 수 있을 것으로 추정하였다.

결 론

전기 생리학적 견지에서 제 2군에 속하는 약물인 propranolol의 항 부정맥 효과와 고농도에서 보이는 β-수용체 차단효과와 무관한 심근 억제효과의 작용기전을 추구하기 위한 연구의 일환으로 심근 mitochondria의 Ca²⁺ 조절작용에 미치는 propranolol의 효과를 세포내 Ca²⁺ 농도 변화와 관련지어 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 심근 mitochondria의 최대 Ca²⁺ 흡수량 및 Ca²⁺ 흡수율은 50.30nmole/mg protein, 초당 0.65nmole/mg 이었고, Ca²⁺ 농도 11.67μM에서 50% 최대 흡수율을 보였다.

2. Mitochondria의 최대 Ca²⁺ 흡수량 및 Ca²⁺ 흡수율은 propranolol에 의해 용량의존적인 억제를 보였으며, 비경쟁적으로 억제되었다(Ki; 6.21×10⁻⁴M).

3. 50μM dinitrophenol 처치에 따른 mitochondria 내막에 흡수된 Ca²⁺의 유리속도는 현저하였으며(9.60 nmole/mg/min), propranolol에 의해 영향을 받지 않았다.

4. Mitochondria의 내막 Na⁺/Ca²⁺ 교환에 있어 Ca²⁺ 유리속도는 [Na⁺]²에 비례 하였으며, 최대 분당 7.43 nmole/mg이었고, Na⁺농도 8.80mM에서 50% 최대 유리속도를 나타내었다.

5. Mitochondria의 Na⁺/Ca[#] 교환은 propranolol에 의해 용량의존적인 억제를 보였고, 비경쟁적으로 억제되었다(Ki; $2.91 \times 10^{-5}M$).

이상에서 propranolol의 심근에 대한 직접적인 수축력 억제효과와 항 부정맥 효과의 일부는 심근 세포의 mitochondria의 Ca[#] 조절작용의 억제에 의한 심근 세포내 Ca[#] homeostasis의 변화에 기인할 것으로 생각하였다.

—ABSTRACT—

Effect of Propranolol on the Ca[#]-regulation of Cardiac Mitochondria

**Choi, Soo Seung, Suh, Kyung Phill,
Shin, Sang Goo*, Kim, Myung Suk*,
Park, Chan Woong* and Lee, Kwang Soo****

*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
and Pharmacology*, College of Medicine,
Seoul National University*

*Department of Pharmacology, College of Medicine,
Chung-Ang University***

Propranolol is one of clinically useful antiarrhythmic agents and electrophysiologically classified as group II. And the negative inotropic effect which is not related to adrenolytic effect has been demonstrated with high concentration of propranolol. On the other hand, it has been well known that the calcium plays a central role in excitation-contraction coupling process of myocardium and also in electrophysiological changes of cell membrane.

Authors studied the effect of propranolol on calcium uptake and release in mitochondria prepared from porcine myocardium to investigate the mechanism of action of propranolol on myocardium. The results are summarized as follows;

1. The maximum calcium uptake of mitochondria was 50.30 nmoles per mg protein with the rate of 0.65 nmole/mg/sec. and the half-maximum velocity of Ca[#]-uptake was achieved at about 11.67 μM Ca[#].

2. The calcium uptake of mitochondria was non-competitively inhibited by propranolol with dose-dependent manner (Ki; $6.2 \times 10^{-4}M$).

3. The calcium efflux from the internal pool of

mitochondria was rapid by the treatment of 50 μM dinitrophenol (9.60 nmole/mg/min.), and it was not affected by propranolol.

4. The rate of sodium-induced calcium efflux appeared to be a function of $[Na^+]^2$ and about 8.80 mM Na⁺ was required to elicit half-maximum velocity of calcium efflux; The maximum velocity was 7.43 nmole/mg protein per minute.

5. The mitochondrial Na⁺/Ca[#] exchanges were noncompetitively inhibited by propranolol with dose-dependent manner (Ki; $2.91 \times 10^{-5}M$).

These results suggest that propranolol affects the intracellular calcium homeostasis which may considered to be the mechanism of action of propranolol on myocardium.

REFERENCES

- Aronson, R.S. and Craneheld, P.E.: *The electrical activity of canine cardiac Purkinje fibers in sodium free, calcium-rich solutions. J. Gen. Physiol.*, 61: 785-806, 1973.
- Carafoli, E.: *Mitochondrial calcium transport; an overview; Calcium-binding proteins; Structure and function, p.121-130, Elsevier North Holland Inc., 1980.*
- Carafoli, E. and Crompton, M.: *The regulation of intracellular calcium by mitochondria. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 307:269:284, 1978.
- Crompton, M., Capano, M. and Carafoli, E.: *The sodium-induced calcium efflux from heart mitochondria. Eur. J. Biochem.*, 69:453-462, 1976a.
- Crompton, M. and Heid, I.: *The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. Eur. J. Biochem.*, 91:599-608, 1978.
- 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., Siegel, E., Salzmann, M. and Carafoli, E.: *A kinetic study of the energy-linked influx of calcium into heart heart mitochondria. Eur. J. Biochem.*, 69:420-434, 1976b.

- Dhalla, N.S., Lee, S.L., Anand, M.B. and Chauhan, M.S.: *Effects of acebutolol, practolol and propranolol on the rat heart sarcolemma. Biochem. Pharmacol.*, **26**:2055-2060, 1977.
- Dhalla, N.S. and Lee, S.L.: *Comparison of the action of acebutolol, practolol and propranolol on calcium transport by heart microsomes and mitochondria. Br. J. Pharmacol.*, **57**:215-221, 1976.
- Ebashi, S.: *Excitation-Contraction coupling. Ann. Rev. Physiol.*, **38**:293-313, 1976.
- 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.
- Hauswirth, O. and Singh, B.N.: *Ionic mechanisms of heart muscle in relation to the genesis and the pharmacological control of cardiac arrhythmias. Pharmacol. Rev.*, **30**:5-63, 1978.
- Heaton, G.M. and Nicolls, D.G.: *The calcium conductance of inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. Biochem. J.*, **156**:635-646, 1976.
- Isenberg, G. and Trantwein, W.: *Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibers controlled by [Ca⁺]_i. Nature (London)*, **253**:273-274, 1975.
- Kass, R.S. and Tsien, K.W.: *Control of action potential duration by calcium in cardiac Purkinje fibers. J. Gen. Physiol.*, **67**:599-617, 1976.
- Lee, C.O. and Fozzard, H.A.: *Activities of potassium and sodium ions in rabbit heart muscle. J. Gen. Physiol.*, **65**:695-708, 1975.
- Lee, K.S. and Choi, S.J.: *Effect of the cardiac glycoside on the Ca⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**:114-120, 1966.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S.: *Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.
- Noack, E.: *The interaction of drug with mitochondrial functions; a possible mechanism for certain pharmacological effect. TIPS*, p22-24, August 1981.
- Page, E. and McCallister, L.P.: *Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Am. J. Cardiol.*, **31**:172-181, 1973.
- Reed, K.C. and Bygrave, F.L.: *A reevaluation of energy-independent calcium ion binding by rat liver mitochondria. Biochem. J.*, **142**:555-566, 1974.
- Reed, K.C. and Bygrave, F.L.: *Methodology for in vitro studies of Ca⁺ transport. Analyt. Biochem.*, **67**:44-54, 1975.
- Sealles, B. and McIntosh, D.A.V.: *Effects of propranolol and its optical isomers on the radiocalcium uptake and the adenosine triphosphatases of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum fraction(SRF). J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **160**:261-267, 1968.
- Sulakhe, P.V. and Dhalla, N.S.: *E-C coupling in heart. VII. Calcium accumulations: subcellular particles in congestive heart failure. J. Clin. Invest.*, **60**:1019-1027, 1971.
- Tsien, R.W.: *Effect of epinehrine on the pacemaker potassium current of cardiac Purkinje fibers. J. Gen. Physiol.*, **64**:293-319, 1974.