

Adrenochrome이 가토 심실근 SR vesicle에서 Ca 이동 및 Ca^{2+} ATPase 활성화에 미치는 영향

고신대학 의학부 흉부외과학교실

조 성 래

(지도교수: 정 황 규)

Effect of Adrenochrome on Calcium Transport and Adenosine Triphosphatase Activities of the Rabbit Sarcoplasmic Reticulum Vesicles

Sung Rae Cho, M.D.

(Directed by Hwang Kiw Chung, M.D.)

*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Kosin Medical College and Gospel Hospital, Pusan, Korea*

= Abstract =

The effect of adrenochrome($5 \times 10^{-6}\text{M} - 5 \times 10^{-4}\text{M}$) on Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase(Ca^{2+} -ATPase) and Ca uptake was studied in the sarcoplasmic reticulum(SR) vesicles obtained from rabbit ventricle. Adrenochrome decreased both Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} uptake, although it had the stronger effect on Ca^{2+} uptake than Ca^{2+} -ATPase showing I_{50} values of $3.16 \times 10^{-5}\text{M}$ and 10^{-6}M , respectively. The inhibitory effect of adrenochrome on Ca^{2+} uptake in SR vesicles was independent of incubation time. Kinetic study of Ca^{2+} uptake activity at different concentrations of ATP showed that the inhibition was a mixed type. Adrenochrome decreased the activation energy on Ca^{2+} -ATPase activity at temperature above 25°C . And adrenochrome increased lipid peroxidation of SR vesicles in a dose dependent manner. These results suggest that cardiodepressant effect of adrenochrome may partly be explained on the basis of its inhibitory effect on the calcium transporting ability of the SR by the alteration of membrane phospholipid as well as the uncoupling of Ca^{2+} pump mechanism.

※ 본 논문의 요지는 부산대학교 의학박사 학위논문으로서 구연발표된 것임.

I. 서 론

실험 동물에 sympathomimetic amine을 대량 또는 반복 투여하면 심근에 심한 손상이 나타나고³⁶⁾ pheochromocytoma를 가진 환자나 norepinephrine을 반복 투여한 환자에서 유사한 병변이 심근에서 관찰됨으로써³²⁾ catecholamine이 심근에 독작용을 나타내는 것은 알려져 있으나 그 자세한 기전은 밝혀져 있지 않다.

Yates와 Dhalla³⁸⁾가 순수한 isoprenaline에 비해 산화된 isoprenaline을 isolated rat heart에 관류시키면 심장조직의 광범위한 미세구조적 손상이 나타나고 수축력이 감소하며 이들 변화가 주입하는 oxidized isoprenaline 농도에 따라 증가하는 것을 관찰하였는데 Dhalla 등¹⁰⁾이 이를 다시 증명함으로써 catecholamine의 심장에 대한 독작용이 적어도 부분적으로는 혈액이나 조직에서 형성된 catecholamine의 산화물에 의한 것이라는 가설이 제시되었다.

Adrenochrome은 catecholamine의 산화물이 하나으로써 isolated rat heart에서 심근손상과 수축력 감소를 초래하는 것으로 보고되어 있으나³⁹⁾ 그 자세한 기전은 밝혀져 있지 않다. 최근 adrenochrome이 sarcolemma의 Na-K-ATPase 활성과 mitochondria의 Ca^{2+} 축적을 억제시키는 것으로 보고 되었다.^{28), 29)} 그러나 심근의 수축과 이완에는 sarcoplasmic reticulum(SR)의 역할이 중요하다는 것은 이미 알려져 있으므로³⁷⁾ adrenochrome이 SR에서의 Ca^{2+} 이동에 어떤 영향을 미치는지를 알아보는 것은 매우 흥미있는 일이라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 가토 심실근에서 SR vesicle을 분리하여 Ca^{2+} -ATPase 활성과 Ca^{2+} 이동에 대한 adrenochrome의 효과를 밝히고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. Sarcoplasmic reticulum vesicle의 분리

실험 재료로는 체중 2~3kg의 가토를 암수 구별없이 사용하였다. 가토의 경부를 타격, 탈골시켜 희생시킨 후 즉시 심장을 떼내어 10mM $NaHCO_3$, 5mM

$NaNO_3$, 15mM Tris-HCl(pH6.8 at 4°C)로 조성된 냉한 용액에 담그고 혈액과 혈관 조직 및 주위 결합조직을 제거한 후 심실의 무게를 재고 위의 용액으로 20% homogenate를 만들었다.

Sarcoplasmic reticulum vesicle은 Harigaya 및 Schwartz¹⁶⁾의 방법으로 분리하였다. 즉 위의 homogenate를 $10,000 \times g$ max에서 두번 원심분리한 후 상층액을 $40,000 \times g$ max에서 45분간 원심분리하였다. 여기서 생긴 pellet를 0.6M KCl, 20mM Tris-HCl (pH6.8 at 4°C)로 다시 homogenize한 후 $45,000 \times g$ max에서 45분간 원심분리하였다. 여기서 생긴 최종 pellet를 0.25M sucrose, 20mM Tris-HCl (pH6.8 at 4°C)로 세척한 후 위의 용액에 단백질이 2~6mg/ml 되도록 부유시켜 보관하였다. 위의 모든 과정은 4°C의 온도에서 행하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등²⁰⁾의 방법으로 측정하였다.

2. 효소 활성의 측정

Ca^{2+} -ATPase 활성은 총 ATPase 활성에서 Mg^{2+} ATPase 활성을 뺀 값으로 하였다. 총 ATPase 활성을 측정하는 incubation medium의 기본 조성은 0.1mM $CaCl_2$, 4mM ATP, 4mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 4mM K-oxalate, 20mM Tris-HCl(pH6.8 at 37°C)이었으며, Mg^{2+} -ATPase 활성은 위의 용액 중 $CaCl_2$ 를 빼고 1mM Ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA)를 첨가한 용액에서 측정하였다. Oxalate는 SR vesicle 내 축적된 Ca^{2+} 에 의한 ATP driven- Ca^{2+} 유입의 억제(back inhibition)을 막아주기 위하여 첨가하였다.

위의 용액에 적당량의 sarcoplasmic reticulum vesicle을 가하여 총량이 1ml이 되게 하였으며 ATP가 없는 용액에서 5분간 preincubation 한 후 ATP를 첨가하여 반응을 시작하였고 52분 후 11.67%의 냉한 perchloric acid를 가하여 반응을 중지시켰다. 약물의 효과를 볼 때는 preincubation 용액에 첨가하였다. ATP에서 분해되어 나온 무기 인산은 Fiske 및 Subbarow의 방법¹²⁾으로 측정하였다. 그외 Na-K-ATPase 활성은 어등¹⁾의 방법으로 하였고 succinic dehydrogenase 활성은 Pennington의 방법²⁵⁾으로 하였

다.

3. ^{45}Ca 이동 측정

SR vesicle을 250mM sucrose, 20mM imidazole pH 6.8에서 단백질 농도가 2mg/ml 되게 부유시켰다. 100mM KCl, 5mM sodium ATP, 5mM MgCl_2 , 0.1mM CaCl_2 , 5mM Tris oxalate, 20mM Tris(pH 6.8 at 37°C), $1\mu\text{Ci/ml}$ ^{45}Ca 포함한 500 μl incubation 용액을 5분간 37°C에서 preincubation 한 후 SR vesicle 10 μl 을 가하였다. 일정시간 후 100 μl 의 incubation 용액을 취하여 pore size가 0.45 μm 인 Millipore filter(HAWP TYPE)를 통해 여과시켜 반응을 정지시킨 후 냉한 0.3M sucrose 용액 4ml로 filter를 세척하였다. Filter를 1ml methoxyethanol을 가하여 녹인 후 liquid scintillation counter(Tncarb 300C)로 filter에 남아있는 ^{45}Ca 의 양을 측정하였다. 용액내의 ^{45}Ca 함량도 같은 방법으로 측정하여 SR의 Ca uptake는 nmole $^{45}\text{Ca}/\text{mg}$ protein으로 나타내었다.

4. Lipid peroxidation의 측정

Lipid peroxidation의 정도는 thiobarbituric acid (TBA) 방법으로 형성된 malonaldehyde를 측정함으로써 평가하였다.⁵⁾ SR vesicle을 여러 농도의 adrenochrome을 포함한 100mM KCl과 40mM Tris(pH 6.8 at 37°C) 용액에서 15분간 처리한 후 0.1mg/ml의 SR 포함한 용액 1ml을 0.5ml의 증류수와 0.5ml의 30% trichloroacetic acid를 넣어 여러번 섞은 후 20분 동안 2000xg에서 원심분리하였다. 상층액에 같은 용적의 0.67% TBA를 가하여 15분간 끓인 후 실온에서 식히고 532nm에서 흡광도를 측정하였다. Malonaldehyde의 molar extinction coefficient $1.52 \times 10^5/\text{M}/\text{cm}$ 를 이용하여²⁶⁾ malonaldehyde의 농도는 nmole/mg protein으로 표시하였다.

실험결과는 mean $\pm$ S.E.M으로 나타내었고 유의성의 검정은 paired Student's t-test를 이용하였으며 P값이 0.05 이하인 것을 유의있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. ATPase 활성도에 대한 adrenochrome의 효과

본 실험에 사용한 SR vesicle의 Ca^{2+} stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase의 활성은 homogenate에 비해 약 5.4배 높았고, sarcolemma의 marker enzyme인 Na-K-ATPase 활성 및 mitochondria의 marker enzyme인 succinate dehydrogenase 활성은 homogenate에 비하여 각각 3.8배 및 3.0씩 낮아 비교적 순수한 SR vesicle임을 알 수 있었다.

그림 1은 Ca^{2+} -ATPase와 Mg^{2+} -ATPase에 대한 adrenochrome의 효과를 나타낸 것이다. 대조군에서 Ca^{2+} -ATPase 활성은 $72.05 \pm 4.02 \mu\text{mole P}/\text{mg protein/hr}$ 이었으며 이는 Jones 등의¹⁸⁾ 결과와 유사하였다. Adrenochrome은 $25 \times 10^{-5}\text{M}$ 부터 억제 효과가 나타나 22% 정도 억제되었고 농도를 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 까지 증가시키에 따라 Ca-ATPase 활성의 억제정도로 증

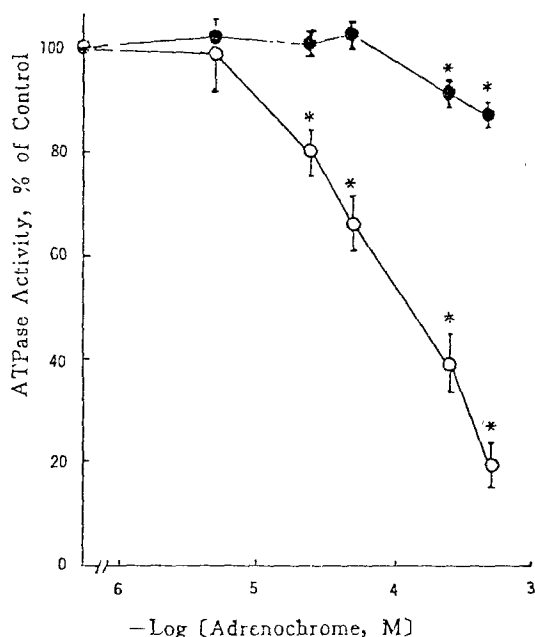


Fig. 1. Effect of adrenochrome on the ATPase activities. Each Value is a mean $\pm$ S.E. of 4 experiments. $\circ$, Ca^{2+} -dependent ATPase; $\bullet$, Mg^{2+} -ATPase. *, Significantly different from the control value ($p < 0.05$).

가하여 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서는 85% 정도 억제되었으며 50% 억제농도(I_{50})는 10^{-4}M 이었다. Mg^{2+} -ATPase의 활성은 $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 이상에서는 억제되는 경향을 보였으나 저농도의 adrenochrome에 의해서는 영향을 받지 않았다.

2. ^{45}Ca uptake에 대한 효과

그림2는 SR vesicle에서 incubation 5분 동안의 ^{45}Ca uptake에 미치는 adrenochrome의 효과에 대하여 관찰한 것이다. Adrenochrome은 Ca^{2+} -ATPase 활성에 대한 작용과는 달리 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 부터 ^{45}Ca uptake을 17% 억제하였고 그 후 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 까지 농도에 따라 억제 정도가 증가하여 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 에서 95% 억제되었으며 50% 억제농도(I_{50})는 $3.16 \times 10^{-5} \text{M}$ 로 Ca^{2+} -ATPase의 I_{50} 보다 3배정도 낮았다.

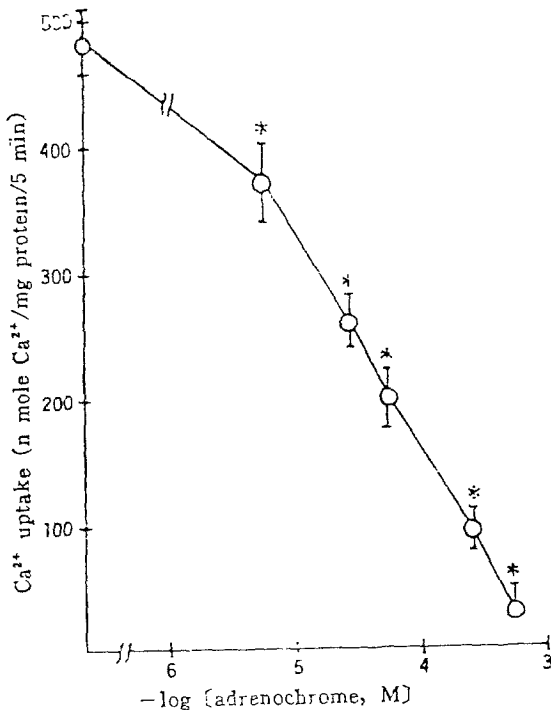


Fig. 2. Effect of adrenochrome on the Ca^{2+} uptake of rabbit SR vesicles. Each value is a mean $\pm$ S.E. of 3 experiments

*, Significantly different from the control value ($p < 0.05$)

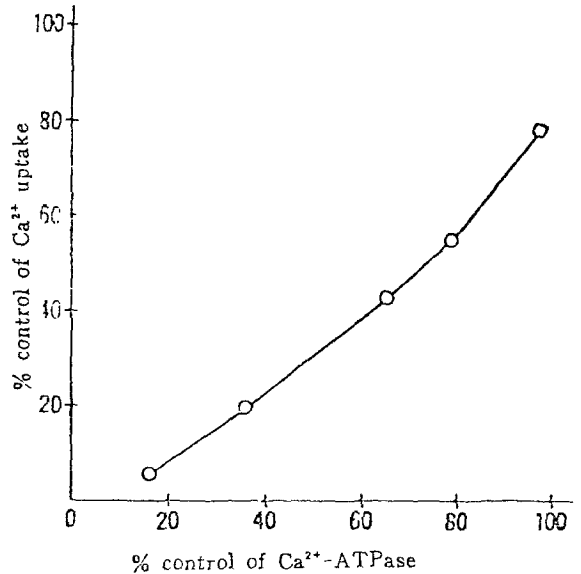


Fig. 3. Interrelationship between the inhibition of Ca^{2+} -uptake and Ca^{2+} -ATPase in rabbit cardiac SR vesicles.

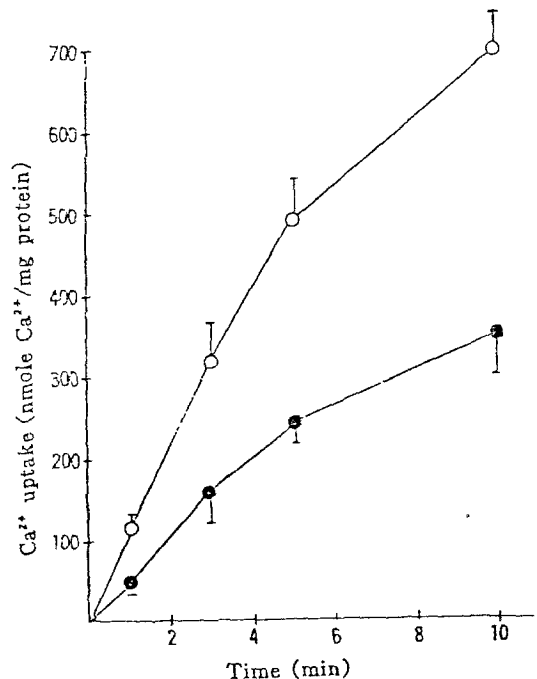


Fig. 4. Time course study of Ca^{2+} uptake activity of the rabbit SR vesicles in the absence (O) or presence (●) of $5 \times 10^{-4} \text{M}$ adrenochrome. Each value represents a mean $\pm$ S.E. of 4 experiments

그림3은 adrenochrome의 Ca^{2+} -ATPase에 대한 억제 정도와 Ca^{2+} uptake에 대한 억제 정도의 상관관계를 나타낸 것으로 Ca^{2+} uptake에 대한 adrenochrome의 억제 정도가 더 컸으나 둘 사이에 밀접한 상관관계가 있었다.

그림4는 ^{45}Ca uptake에 대한 $3 \times 10^{-5}\text{M}$ adrenochrome의 효과를 incubation 시간에 따라 나타낸 것으로 incubation 1분 후부터 억제효과가 나타나 10분까지의 incubation 시간동안 그 억제 정도에 변화가 없었다.

3. ATP 농도의 영향

그림5는 incubation 용액내 ATP 농도를 변화시키면서 Ca^{2+} uptake를 adrenochrome 존재시와 존재하지 않을 때 측정하여 Lineweaver-Burk plot로 나타낸 것이다. 대조군에서 V_{max} 는 $572.76\text{nmole/mg protein/5min}$ 이었고 K_m 값은 0.69mM 이었으며 이 값은 정등³⁾이 심근의 Ca^{2+} -ATPase에서 관찰한 값과 유사하였다. Adrenochrome 존재시 V_{max} 는 $33.90\text{nmole/mg protein/5min}$ 로 감소하였고 K_m 은 1.

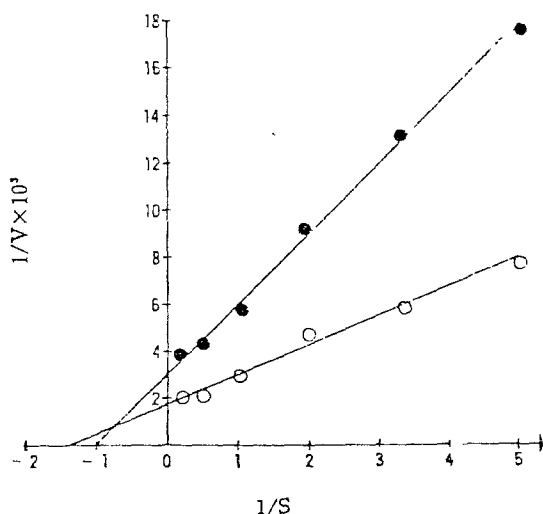


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots of the rabbit heart SR vesicles Ca^{2+} uptake activity in the absence(○) or presence(●) of $3 \times 10^{-5}\text{M}$ of adrenochrome at different concentrations of ATP. Each value is mean $\pm$ S.E. of 4 experiments

0.2mM 로 증가하여 mixed type의 억제 양상을 보였다.

4. Incubation 온도의 영향

그림6은 incubation 용액내 온도를 15°C 에서 37°C 까지 변화시키면서 adrenochrome 존재시와 존재하지 않을 때 Ca^{2+} -ATPase 활성도를 측정하여 Arrhenius plot한 것이다. 본 실험에서 용액의 pH는 각 온도에서 6.8로 맞추었다. Arrhenius plot상 25°C 에서 회절점이 나타났으며 이는 Ortega와 Mas-Oliva²¹⁾ 및 이와 이²⁾의 결과와 일치하였다. Adrenochrome 존재시에도 25°C 에서 회절점이 나타났으나 온도가 감소함에 따라 그 억제 효과는 감소하였다.

표 1은 그림 6에서 $\ln k = E_a/RT + \log A$ 와 $Q_{10} = \text{antilog}(10 \text{ slope})$ 공식을 이용하여²⁷⁾ activation energy(E_a)와 temperature coefficient(Q_{10})을 계산한 것

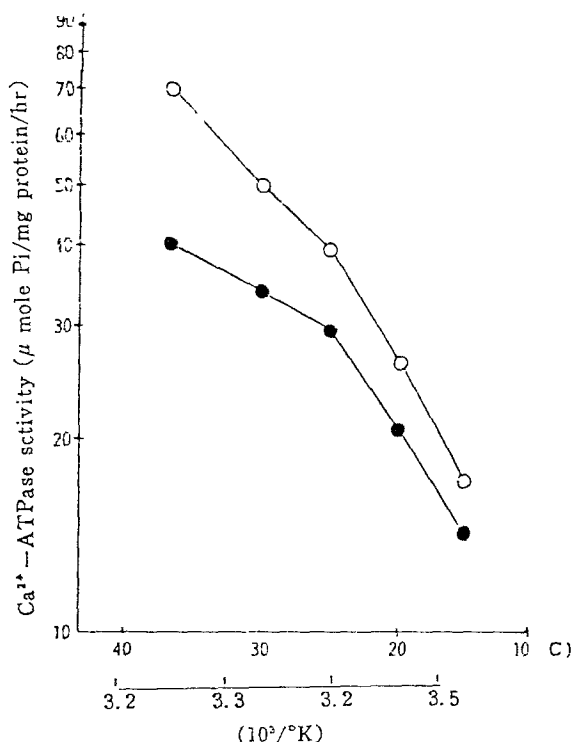


Fig. 6. Arrhenius plot of SR Ca^{2+} -ATPase activity. Each value represents mean for 4 experiments. ○, control, ●, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ adrenochrome

Table 1. Effect of Adrenochrome on Activation Energy(Ea) and Temperature Coefficient(Q₁₀) of Cardiac SR Ca²⁺-ATPase.

Temperature range	Ea (Kcal/mol)		Q ₁₀	
	Control	Adrenochrome	Control	Adrenochrome
15-25	13.99	12.23	2.27	2.04
25-37	9.28	4.76	1.64	1.29

이다. 회절점보다 높은 농도에서 adrenochrome은 대조군에 비해 Ea 및 Q₁₀을 감소시켰다.

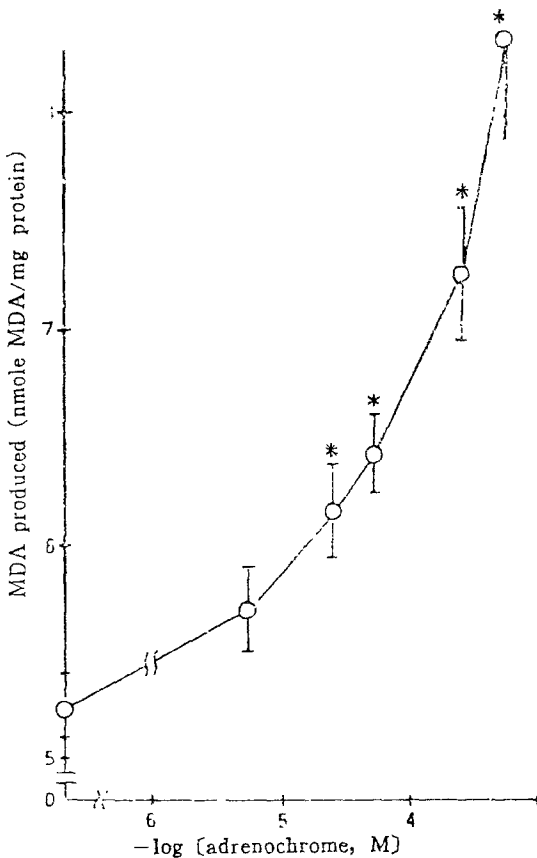


Fig. 7. Effect of adrenochrome on malonaldehyde production of SR vesicles. Each value is a mean $\pm$ S.E. of 4 experiments.

*, Significantly different from the control value ($p < 0.05$)

5. Lipid peroxidation에 대한 효과

그림7은 adrenochrome이 SR vesicle에서 lipid peroxidation을 증가시키는지 알아보기 위하여 여러 농도의 adrenochrome 존재하에서 형성되는 malonaldehyde(MDA)의 양을 측정하였다. 2.5×10^{-5} M부터 adrenochrome 농도가 증가함에 따라 MDA의 생성되는 양도 증가하여 5×10^{-4} M에서는 대조군의 약 54%까지 증가하였다.

IV. 고 찰

Catecholamine의 심근에 대한 독작용은 실험 동물에서 뿐만 아니라³⁶⁾ Vliet 등³⁷⁾이 pheochromocytoma를 가진 환자에서 처음 보고한 이래 norepinephrine을 반복하여 투여한 환자 등에서도 관찰됨으로써 사람에서도 증명되었고 이후 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으나 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 최근 여러 연구자들에 의해^{10,38)} catecholamine의 독작용이 catecholamine의 직접작용이 아니고 적어도 부분적 요소는 catecholamine의 산화물에 의한 것이라는 것이 주장되었다. Adrenochrome은 catecholamine의 산화물의 일종으로 체내 catecholamine의 농도가 비정상적으로 높아 monoamine oxidase와 catechol-O-methyl-transferase 같은 정상적인 inactivating system에 의해 완전히 대사되지 않을 때 다른 효소계에 의해 산화되고^{7,17,23,39)} cytochrome C를 통한 자가촉매현상에 의해 형성된다.¹¹⁾ 최근 Yates 등³⁹⁾에 의해 adrenochrome을 isolated rat heart에 관류시켰을 때 심근의 손상과 수축력 감소를 일으킨다는 것이 보고되었다. 본 실험에서 adrenochrome은 SR vesicle의 Ca²⁺ uptake를 억제시켰다

(그림2). 심근에서 분리한 SR vesicle은 ATP와 Mg^{2+} 존재하에서 Ca^{2+} 를 농도차에 역행해서 축적할 수 있고 이 축적은 막에 결합하고 있는 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Ca^{2+} -ATPase)에 의해 유리되는 에너지를 이용하는 것으로 알려져 있는데^{12,21)} adrenochrome은 Ca^{2+} -ATPase도 농도에 따라 억제하므로(그림1) 이러한 Ca^{2+} uptake의 억제는 Ca^{2+} pump에 대한 adrenochrome의 작용인 것으로 생각된다. 그러나 Ca^{2+} -ATPase에 대한 억제 농도보다 Ca^{2+} uptake에 대한 억제 정도가 더 컸으며 이는 SR에서 Ca^{2+} -uptake를 억제하는 여러 약물에서도 관찰된 바 있다.⁹⁾ 이와 같은 현상은 Ca^{2+} uptake가 Ca^{2+} -ATPase에 비해 더 완전한 SR membrane의 integrity를 요구하기 때문인 것으로 생각된다.

ATP 농도를 변화시키면서 Ca^{2+} uptake를 측정하여 얻은 값을 Lineweaver-Burk plot를 한 결과 adrenochrome은 $V_{\max}$ 값을 감소시킬 뿐만 아니라 K_m 값도 증가시킴으로써 mixed type의 억제를 나타내었고(그림5) Ca^{2+} -ATPase 뿐만 아니라 Mg^{2+} -ATPase 활성도 억제시킴으로써(그림1) 이는 SR에서 adrenochrome에 의한 Ca^{2+} 의 이동의 억제가 생체막의 특수한 한 부위에 작용하여 나타나는 것이 아니라 세포막에 대한 복합적인 작용에 의해 나타남을 시사한다.

본 실험결과로서 adrenochrome이 어떤 기전에 의해 Ca^{2+} uptake 및 Ca^{2+} -ATPase 활성을 억제하는지에 대해서는 정확히 알 수는 없다. 그러나 SR의 Ca^{2+} 이동단백질 주위에는 lipid annulus가 있고³³⁾ 이 lipid annulus의 polar head group의 전하⁴⁾ fatty acid의 불포화정도^{34,35)} 그리고 이중 결합의 위치³⁰⁾가 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 SR막의 지질층에 변화를 유발시키는 약물은 Ca^{2+} 이동 및 효소활성에 영향을 미칠 수 있을 것이다. 본 실험 결과 adrenochrome이 온도 변화에 따라 Ca^{2+} -ATPase 활성에 대한 억제효과가 달랐는데 특히 25°C 이상의 온도에서 adrenochrome이 Arrhenius plot상의 기울기를 감소시켰다. 이러한 결과는 adrenochrome이 SR막의 지질층에 변화를 유발시킬 것으로 추측할 수 있으며 이는 lipid peroxidation에 대한 adrenochrome의 실험 결과로서 더욱 뒷받침된

다. Lipid peroxidation은 주로 불포화지방산의 이중 결합 부위에 변화를 초래하는 것으로 알려져 있다.^{10),38)} 본 실험 결과 adrenochrome의 농도증가에 따라 lipid peroxidation이 증가함으로써 이 약물이 직접 SR 막의 지질층에 영향을 미치기보다 lipid peroxidation을 증가시킴으로써 간접적으로 지질층에 영향을 미쳐 Ca^{2+} 의 이동을 억제할 가능성을 암시하고 있다. Lipid peroxidation의 증가가 SR에서의 Ca^{2+} 이동에 영향을 줄 수 있다는 것은 심근 허혈시도 관찰되었다. 즉 허혈시 나타나는 SR의 Ca^{2+} uptake의 감소가 적어도 일부는 ischemia시 형성된 free radical에 의한 lipid peroxidation에 의한 것이라는 것이 보고되어 있다.⁶⁾ 그러나 본 실험에서 adrenochrome에 의한 lipid peroxidation의 증가정도가 적어 adrenochrome에 의해 Ca^{2+} 이동의 억제를 완전히 설명할 수는 없기 때문에 Ca^{2+} pump 기전의 uncoupling도 완전히 배제할 수는 없는 것으로 생각된다.

SR에서 adrenochrome에 의한 Ca^{2+} 이동의 억제가 수축력의 감소와 어떻게 연결되는지는 명확히 설명하기 어렵다. 그러나 심근의 수축에는 활동전위에 의해 외부에서 유입되는 Ca^{2+} 과 이에 의해 SR에서 유리되는 Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release)가 중요한 역할을 한다는 것은 많은 연구자들에 의해 보고되었다.³⁷⁾ 따라서 adrenochrome이 SR에서의 Ca^{2+} 이동 기전을 억제하여 intracellular Ca^{2+} store를 감소시킴으로써 수축력의 저하를 초래하는 것으로 생각해 볼 수 있다. 이러한 가정은 심근의 수축력을 감소키는 propranolol과 quinidine 등이 SR에서의 Ca^{2+} 축적 능력을 억제시키는 것으로 알려져 있고¹⁵⁾ 여러가지 형태의 심부전에서 SR의 Ca^{2+} 이동 능력에 장애가 온다는 것이 관찰되어 있으므로^{8,14,22)} 더욱 뒷받침된다. Adrenochrome은 mitochondria의 Ca^{2+} 이동을 억제시키는 것으로 알려져 있고^{28),29)} mitochondria는 세포내부 Ca^{2+} 의 가장 큰 저장고이고³⁷⁾ 세포내 Ca^{2+} 의 overload시 이차적으로 SR에서의 Ca^{2+} 이동이 억제된다는 보고도 있기 때문에¹⁹⁾ adrenochrome의 작용에 의한 심근의 변화기전을 전적으로 SR의 Ca^{2+} 이동억제만으로 설명하기는 어려우나 적어도 부분적으로는 이 기전이 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

V. 요 약

Adrenochrome이 심근의 수축력 감퇴를 나타내는 기전을 밝히기 위하여 가토 심실근에서 sarcoplasmic reticulum vesicle을 분리하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Adrenochrome은 SR의 Ca^{2+} -ATPase 및 Ca^{2+} uptake를 농도에 따라 억제하였고 그 억제정도는 Ca^{2+} uptake에 대해 더 컸다.
2. Adrenochrome에 의한 Ca^{2+} 이동의 억제는 incubation 시간에 영향을 받지 않았다.
3. ATP 농도를 변화시키면서 Ca^{2+} uptake에 대한 adrenochrome의 억제효과를 관찰한 결과 $V_{\max}$ 는 감소시켰고 K_m 은 증가시켜 mixed type의 억제를 나타내었다.
4. Adrenochrome은 25°C보다 높은 온도에서 Ca^{2+} -ATPase에 대한 activation energy를 감소시켰다.
5. Adrenochrome은 lipid peroxidation을 증가시켰다.

이상의 결과는 adrenochrome이 Ca^{2+} pump에 대한 직접 작용 뿐만 아니라 막의 인지질에 변화를 일으켜 SR에서의 Ca^{2+} 이동을 억제시키며 이러한 SR에 대한 억제작용이 adrenochrome에 의한 심근 수축력의 억제와 연관하다는 것을 시사한다.

* (본 연구를 위해서 수고하신 부산의과대학 생리학 교실 이상호 교수님 이하 교실원께 감사를 드립니다.)

참 고 문 헌

1. 어윤선, 우재석, 한복기, 이상호 : 가토심장 Na-K-ATPase 및 K^{+} -pNPPase의 최적 pH에 미치는 Vanadate의 영향. 대한생리학회지 18(2) : 163, 1984
2. 이철승, 이상호 : 가토 골격근 Actomyosin Ca^{2+} -ATPase 활성도에 관한 연구 -pH와 온도의 상관작용 및 수중 억제제의 영향. 부산의대잡지 19(2) : 47, 1979
3. 정황규, 정수상 : 가토심장근과 골격근에서의 Ca^{2+} ATPase 활성 및 Ca^{2+} 의 이동(미발표),

1985

4. Bennett JP, Smith GA, Houslay MD, Hesketh TR, Metcalfe JC and Warren GB : The phospholipid headgroup specificity of an ATP-dependent calcium pump. *Biochim Biophys Acta* 513 : 310, 1978
5. Bidlack WR and Tappel AL : Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8 : 177, 1973
6. Demopoulos HB : The basis of free radical pathology. *Fed Proc* 32 : 1859, 1973
7. Derouaux G : The in vitro oxidation of adrenalin other diphenol amines by phenol oxidase. *Archs Int Pharmacodyn Ther* 69 : 205, 1943
8. Dhalla NS, Das PK and Sharma GP : Subcellular basis of cardiac contractile failure. *J Mol Cell Cardiol* 10 : 363, 1978
9. Dhalla NS and Lee SL : Comparison of the actions of acebutolol, practolol and propranolol on calcium transport by heart microsomes and mitochondria. *Br J Pharmac* 57 : 215, 1976
10. Dhalla NS, Yates JC, Lee SL and Singh A : Functional and subcellular changes in the isolated rat heart perfused with oxidized isoproterenol. *J Mol Cell Cardiol* 10 : 31, 1978
11. Falk JE : The formation of hydrogen carriers by haematin-catalyzed peroxidations. *Biochem J* 44 : 369, 1949
12. Fanrurg B and Gergely J : Studies on adenosine triphosphate-supported calcium accumulation by cardiac subcellular particles. *J Biol Chem* 240 : 2,721, 1965
13. Fiske LH and Subbarow Y : The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66 : 375, 1925
14. Gertz EW, Hess ML, Lain RF and Briges FN : Activity of vesicular calcium pump in the spontaneously failing heart-lung preparation. *Circ Res* 20 : 477, 1967
15. Halla NS, Ziegelhoffer A and Harrow JAC : Regulatory role of membrane systems in heart func-

- tion. *Can J Physiol Pharmacol* 55(1) : 211, 1977
16. Hangaya S and Schwartz A : *Rate of calcium binding and uptake in normal and failing human cardiac muscle Membrane vesicles (relaxing system and mitochondria)*. *Circ Res* 35 : 781, 1969
17. Iisalo E and Rekkannen A : *Enzyme action on adrenaline and noradrenaline studies on heart muscle in vitro*. *Acta Pharmacol Toxicol* 15 : 157, 1958
18. Jones LR, Besch HR, Sutko JL and Willerson JT : *Ryanodine induced stimulation of net Ca^{2+} uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles*. *J Pharmacol Exp Ther* 109 : 48, 1979
19. Lee SL and Dhalla NS : *Subcellular calcium transport in failing hearts due to calcium deficiency and overload*. *Physiol* 231 : 1, 159, 1979
20. Lowry OH, Rosenbrough NL, Farr AL and Randell RJ : *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 193 : 265, 1951
21. Meis L and Hasselbach W : *Acetyl phosphate as substrate for Ca^{2+} uptake in skeletal muscle microsomes*. *J Biol Chem* 246 : 4759, 1971
22. Nayler WG, McInnes I, Chipperfield D, Carson V and Kurtz JB : *Ventricular function and the calcium-accumulating activity of the sarcoplasmic reticulum*. *J Mol Cell Cardiol* 1 : 307, 1970
23. Odajima T : *Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood II. Oxidation reduction reaction mechanism of the myeloperoxidase*. *Biochim Biophys Acta* 235 : 52, 1971
24. Ortega A and Mas-Oliva J : *Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca^{2+} + Mg^{2+}) -ATPase from cardiac muscle*. *Biochim Biophys Acta* 773 : 231, 1984
25. Pennington RJ : *Biochemistry of dystrophic muscle. Mitochondrial succinatetrazolium reductase and adenosine triphosphatase* *Biochem J* 30 : 649, 1961
26. Placer ZA, Cushman LL, and Johnson. BC : *Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems*. *Anal Biochem* 16 : 359, 1966
27. Segel IH : *Enzyme kinetics*. John Wiley, New York, 1975
28. Takeo S and Dhalla NS : *Effects of adrenochrome on calcium accumulation by heart membranes*. *Proc Can Fed Biol Soc* 21 : 139, 1976
29. Takeo S, Fligel L, Beamish RE and Dhalla NS : *Effects of adrenochrome on rat heart sarcolemmal ATPase activities*. *Biochem Pharmacol* 29 : 559, 1980
30. The R and Hasselbach W : *Unsaturated fatty acids as reactivators of the calcium-dependent ATPase of delipidated sarcoplasmic membranes*. *Eur J Biochem* 39 : 63, 1973
31. Valerno DM and McCormack JJ : *Xanthine oxidase-mediated oxidation of epinephrine*. *Biochem Pharmacol* 20 : 47, 1971
32. Vliet PDV, Burchell HB and Titus JL : *Focal myocarditis associated with pheochromocytoma*. *N Engl J Med* 274 : 1102, 1966
33. Warren GB, Houslay MD, Metcalfe JC and Birdsall NJM : *Cholesterol is excluded from the phospholipid annulus surrounding an active calcium transport protein* *Nature (London)* 255 : 684, 1975
34. Warren GB and Metcalfe JC : *What is the phospholipid specificity of a reconstituted calcium pump* *Biochem Soc Trans* 5 : 517, 1977
35. Warren GB, Toon PA, Birdsall NJM, Lee AG and Metcalfe JC : *Reversible lipid titrations of the activity of pure adenosine triphosphatase lipid complexes* *Biochemistry* 13 : 5501, 1974
36. Weiner N : *Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines* In Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics*. edited by Gilman AG et al. New York, Macmillan Publishing Co, 1980, pp. 139
37. Winegard S : *Electromechanical coupling in heart muscle*. In *Handbook of Physiology* section 2 *The cardiovascular system*. volume 1. *The heart*. Edited by Berne RM. et al. Bethesda Am Physiol Society, 1979, pp. 393

38. Yates JC and Dhalla NS : *Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. J Mol Cell Cardiol* 7 : 807, 1975
39. Yates JC, Taam GML, Singal PK, Beamish RE and Dhalla NS : *Protection against adrenergic-induced myocardial damage by various pharmacological interventions. Br J Exp Pathol* 61 : 242, 1980
-