

Ouabain 점적투여후 토끼심장에 있어서 ³H-Ouabain 결합에 관한 연구

金 相 建 · 金 洛 斗

서울대학교 藥學大學

(Received, June 2 1986)

³H-ouabain Binding in Heart Following Infusion of Ouabain in Rabbit

Sang Geon Kim and Nak Doo Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—Many experiments have showed that the sodium and potassium ion transporting system and the Na, ⁺K⁺-ATPase activity of membrane fragments are inhibited by digitalis glycosides and that the pump may be associated with the pharmacological receptor for the drugs. The aim of our investigation is to elucidate the ouabain binding sites occupation in heart following infusion of ouabain to intact animals by the ³H-ouabain binding assay. Lethal dose and 26 percent of lethal dose of ouabain were infused to intact rabbit through ear vein. Microsomal fraction was fractionated from ouabain treated rabbit heart. ³H-ouabain binding to these fraction *in vitro* was studied by the Schwartz's method. ³H-ouabain binding to heart microsomal fraction was also studied following infusion of ginseng ethanol extract and caffeine to rabbits respectively. 1) The infusion of lethal dose ouabain (113 μ g/kg) inhibited the specific ³H-ouabain binding to rabbit heart microsomal fraction to the level of 60% (p<0.01) of control group and the infusion of 26% of lethal dose of ouabain led to the level of 79% (p<0.01) of the control group. 2) Time course of binding of 0.4 μ M ³H-ouabain to microsomal fraction from rabbit heart following infusion of lethal and 26% of lethal dose of ouabain showed dose dependence at various incubation time. 3) Compared with control, only slight change of K_d and B_{max} was detected in *in vitro* ³H-ouabain binding after infusion of ginseng ethanol extract (300mg/kg) to rabbit. 4) In caffeine infusion group, ³H-ouabain binding yielded nearly the same results as control group.

혈장막의 Na⁺, K⁺-ATPase가 디기탈리스 배당체의 수용체일 것이라는 실험적 증거는 많은 연구자들에 의해 보고된 바 있다.¹⁻⁴⁾ 즉, 디기탈리스 강심배당체는 혈장막의 Na⁺, K⁺-ATPase에 결합하여 이 효소를 억제함으로써 결과적으로 세포내 Ca이온의 증가를 초래하여 양성변력 효과를 나타낸다고 한다. 디기탈리스 강심배당체의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 결합 및 억제 작용은 *in vitro*에서 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 증명되고 있다.

Matsui⁵⁾ 등은 ³H-digoxin을 이용하여 강심배당체가 Na⁺, K⁺-ATPase에 농도에 비례하여 결합함을 보고하였으며, 또한 Schwartz⁶⁾ 등은 디곡

신을 개의 한쪽 심장 동맥에 투여한후 시험관내에서 ³H-ouabain 결합률을 다른 쪽 심장과 비교한 결과 처치군에서 훨씬 낮은 결합률을 관찰하였다.

또한, Dutta⁷⁾ 등은 매우 고용량의 ³H-ouabain을 적출한 개의 심장에 관류하거나, 처치하지 않은 개에게 투여하여 분리한 nuclear subcellular fraction, mitochondria subcellular fraction 및 ATPase subcellular fraction 중 ATPase subcellular fraction에 특이적으로 ³H-ouabain이 축적됨을 관찰하고, Na⁺, K⁺-ATPase활성이 정상군보다 현저히 억제됨을 보고한 바 있다. 그러나 처치하지 않은 동물에 ouabain을 *in vivo*로 투여한

후 적출 심장에서 ^3H -ouabain 결합 분석을 하여 그 결합부위가 미리 점유편을 *in vitro* 상에서 확인하여 보고한 논문은 없다.

본 연구에서는 토끼에 ouabain을 투여했을 때 ouabain의 Na^+ , K^+ -ATPase에 대한 결합이 ouabain 특이성 결합부위에 용량의존적으로 결합하는지의 여부를 검토하기 위하여 ouabain을 정맥으로 투여한 후 적출심장에서 ^3H -ouabain 결합 분석을 시도하였다.

한편 Lee⁸⁾ 등은 ouabain의 스테로이드 핵과 유사 구조를 갖는 인삼성분 분획이 시험관내에서 ouabain 결합부위에 영향을 준다는 보고를 하였고, 한편 Kim⁹⁾ 등은 인삼을 장기간 투여시 심장의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성이 억제됨을 보고한 바 있으므로 인삼을 미리 점적투여 하였을 때 ^3H -ouabain 결합부위에 미치는 영향을 검토하였다.

또한 강심효과를 Ca^{++} 유발성 Ca^{++} 유리의 약리기전으로 해석하는 카페인의 경우를 본실험의 대조 약물로서, ouabain 결합부위에 미치는 영향을 검토하였다.

실 험 방 법

실험재료—1) Ouabain 정맥주사 용액—주사용 증류수에 ouabain(Sigma chemical company)을 용해하여 ml당 $4\mu\text{g}$ 이 되게 하였다.

2) 인삼 에탄올 엑기스—인삼을 분쇄하여 70% 에탄올로 70°C 에서 추출하고 이 추출액을 rotary evaporator에서 감압 농축하였다. 실험시 일정량을 칭량하여 증류수에 용해하고 HA 0.45 μm Millipore filter에 여과한 후 여액을 정맥주사용 시료로 사용하였다.

3) 카페인 정맥주사 용액—주사용 증류수에 카페인을 용해하여 ml당 6mg이 되게 하였다.

4) 실험동물—1.8~2.5kg의 건강한 웅성의 흰 토끼를 구입하여 일주일간 사육한 후 실험에 사용하였다.

실험방법—1) 치사량 및 26% 치사량 ouabain의 정맥점적 투여후 ^3H -ouabain 결합에 미치는 영향—(1) 토끼의 귀정맥을 통해서 ouabain을 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 정맥주사한 후 계속해서 $1.22\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$

의 점적속도로 90 ± 10 분간 투여하여 총 투여량 $113\mu\text{g}/\text{kg}$ 인 치사량까지 점적투여하였다. 26% 치사량의 ouabain 용량은 Dutta⁷⁾ 등의 방법에 따라 점적시간을 조절하여 정하였으며, 부하용량으로 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 정맥주사한 후 $1.3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 의 속도로 20 ± 3 분간 투여하여 총 투여량 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 점적투여하였다. 대조군은 두부를 강타하여 치사시킨후 약물투여군과 같은 절차에 의해 실험하였다.

치사후 곧 개복하여 심장을 즉시 적출한 후 0.25M ice-cold sucrose solution에 넣었다. 적출 심장의 처리는 Shimada¹²⁻¹⁴⁾ 등의 방법을 이용하였다. 지방조직과 결합조직을 제거한 후 전 심장을 세절하고 0.25M Sucrose, 5mM Na_2EDTA , 5mM 히스티딘, 0.1% Sod. deoxycholate, 10 μM Dithiothreitol 및 Tris(pH 7.0) 냉용액^{15,16)} 9배 용량을 넣어 biotron을 이용하여 중간에 15초씩 휴식하면서 5초간 3회 homogenize시켰다.

균질화된 액은 테프론을 입힌 유리 유발로 2회 재현탁시킨 후 1,000g에서 15분간 원심분리하여 상정액을 취하고 상정액을 20,000g에서 15분간 원심분리하여 다시 상정액을 Beckman Model L5-65B ultracentrifuge로 100,000g에서 60분간 초원심분리하였다.

pellet을 4~7ml의 10mM Tris/Cl(pH 7.4) 및 0.25M Sucrose 용액으로 세척한 후 100,000g에서 30분간 초원심분리하였다. 세척된 pellet을 다시 10mM Tris/Cl (pH 7.4) 및 0.25M Sucrose 용액에 녹여 0.4~0.6mg/ml의 농도로 조절하였다. 이상의 조작은 4°C 에서 행하였다(Fig. 1).

^3H -ouabain(Amersham, 33Ci/mmol, 1mCi/ml)을 cold ouabain으로 희석하여 $2\times 10^{-6}\text{M}$ ^3H -ouabain(1,000 cpm/pmol, 1,000 mCi/mmol)을 조제하였고 ^3H -ouabain을 여러 농도로 갖는 시험관을 10분간 전배양하였다. 반응은 단백용액을 첨가하면서 시작하였고 37°C 에서 반응시간은 60분으로 하였다. 반응종료는 반응액을 0.9ml 취하여 속히 흡인여과시킨 후 여지를 20ml의 냉 증류수로 세척하고 이 여지를 건조시킨 후 6ml의 scintillation cocktail에 넣어 완전용해를 위해서 12시간 이상 방치한 후 방사능을 측정하였다.

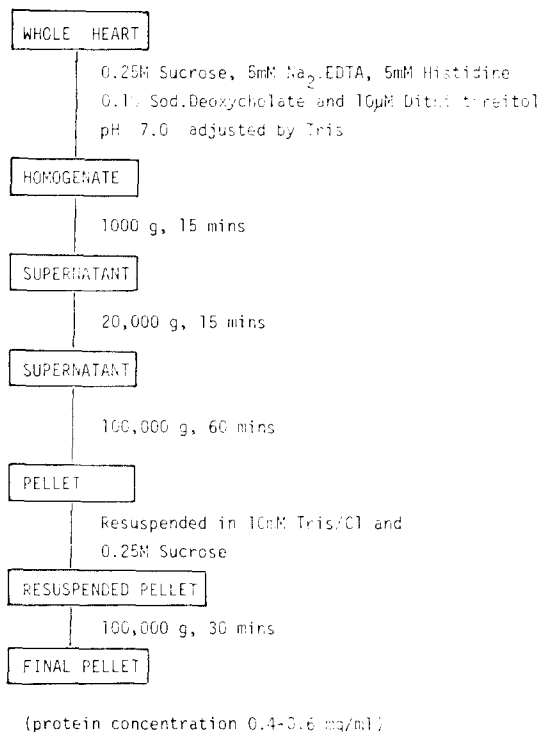


Fig. 1-Flow scheme for isolation of a microsomal fraction from rabbit heart.

표준용액은 2 \times 10⁻⁶M ³H-ouabain 20 μ l를 취하여 동일량의 scintillation cocktail에 넣어 동시 측정하였다. 결합률은 다음과 같이 계산하였다.¹⁷⁾

$$\text{Standard} = \frac{\text{total cpm}}{20 \times 2 \times 10^{-6} \times 10^6} = a \text{ cpm/pmol}$$

$$\text{Binding} = \frac{x \text{ cpm}}{a \times 0.05 \times 0.9} = b \text{ pmol/mg protein}$$

(protein 0.5mg/ml 기준)

비특이적 결합은 5mM Tris-phosphate(pH 7.4)를 200mM KCl로 대체하고 나머지 조성은 같게 하여 반응액으로 사용하였고 총결합치에서 비특

이적 결합치를 제거한 값을 특이적 결합으로 하였다. Counting efficiency는 external standard ratio방법에 의하였고 본 실험에서는 약 42%였다.

(2) 반응시간 변화에 따르는 결합의 측정¹⁸⁾

전술한 바와 같은 조성이나 ³H-ouabain의 농도를 4 \times 10⁻⁷M로 고정시킨 후 전체 반응액을 6ml로 하였고 1, 3, 6, 10 및 30분 마다 반응액을 0.8ml 취하여 흡인여과하고 전과 동일한 방법으로 행하였다.

2) 인삼 에탄올 엑기스 점적투여 후 ³H-ouabain 결합에 미치는 영향—토끼의 귀정맥을 통하여 처음 10mg/kg을 정맥주사한 후 3.6mg/kg/min의 속도로 약 80분간 점적투여하여 총 투여량은 300mg/kg 투여하였고 (1)의 실험방법에 의하여 결합을 측정하였다.

3) 카페인 점적투여 후 ³H-ouabain 결합에 미치는 영향—토끼의 귀정맥을 통하여 처음 3mg/kg을 정맥주사한 후 계속해서 1.7mg/kg/min의 점적속도로 약 85분간 투여하여 전체량 150mg/kg을 투여하였다. 또한 (1)의 실험방법에 의하여 결합을 측정하였다.

이상의 각 약물의 부하용량 점적속도, 점적시간 및 총량은 Table I에서와 같다.

composition of incubation medium

Protein	50 μ /ml
Tris/Cl	50mM
MgCl ₂	5mM
Tris. Pi	5mM
³ H-ouabain	several conc.
Total volume	2ml

Table I-Infusion of drugs.

Treatment	Loading dose	Infusion/min	Infusion time(min)	Total amount
26% of L.D. ouabain	3 μ g/kg	1.3 μ g/kg	20 \pm 2	30 μ g/kg
Lethal dose ouabain	3 μ g/kg	1.22 μ g/kg	90 \pm 7	113 μ g/kg
Ginseng EtOH Ex.	10mg/kg	3.6mg/kg	80 \pm 5	300mg/kg
Caffeine	3mg/kg	1.7mg/kg	80 \pm 5	150mg/kg

실험 결과

치사량 및 26% 치사량 ouabain의 정맥접적 투여 후 ^3H -ouabain 결합에 미치는 영향 Ouabain을 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 정맥주사한 후 $1.3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 의 점적속도로 약 90분 및 20분씩 정맥접적 투여한 후 적출심장에서 분리한 마이크로솜 분획에서 ^3H -ouabain결합을 측정된 결과 ^3H -ouabain 각 농도에 따라 정상군은 2.28 ± 0.15 , 4.69 ± 0.24 , 8.56 ± 0.35 , 12.52 ± 0.51 , 16.81 ± 1.00 , 18.15 ± 0.81 pmol/mg protein이였으며 26% 치사량 ouabain 투여군은 2.72 ± 0.42 , 3.99 ± 0.31 , 7.97 ± 0.65 , 10.41 ± 0.78 , 13.76 ± 1.21 , 14.13 ± 0.45 pmol/mg protein이었다. 치사량의 ouabain 투여군은 1.68 ± 0.19 , 2.63 ± 0.19 , 5.42 ± 0.24 , 8.09 ± 0.39 , 10.25 ± 0.74 , 11.39 ± 0.62 pmol/mg protein을 나타냈다. 이때 각경우 ^3H -ouabain의 농도는 10^{-8} , 2×10^{-8} , 5×10^{-8} , 10^{-7} , 2×10^{-7} , $4\times 10^{-7}\text{M}$ 이었다(Fig. 2, 3, 4).

Incubation medium중의 ^3H -ouabain의 농도를 $4\times 10^{-7}\text{M}$ 로 고정 한 후 배양시간을 각기 달리 하여 1, 3, 6, 10 및 30분마다의 ^3H -ouabain 결합을

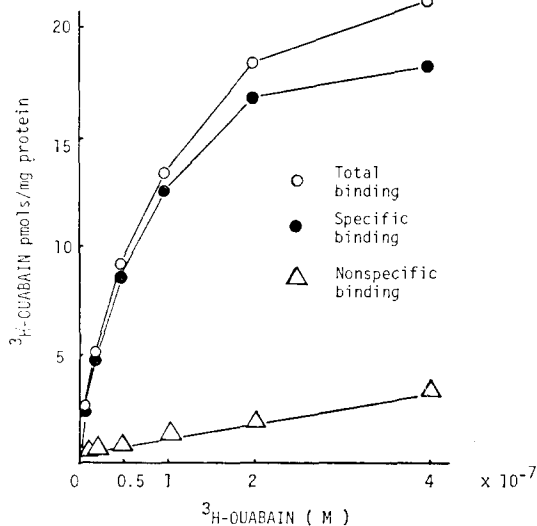


Fig. 2-Binding of ^3H -ouabain to microsomal fraction Na^+ , K^+ -ATPase from rabbit heart versus ^3H -ouabain concentration. Specific binding is the difference between total binding and nonspecific binding.

관찰하였을 때 정상군은 6.05 ± 0.42 , 13.75 ± 0.43 , 16.77 ± 0.49 , 16.12 ± 0.46 , 16.58 ± 0.77 pmol/mg protein을 나타냈고 26% 치사량의

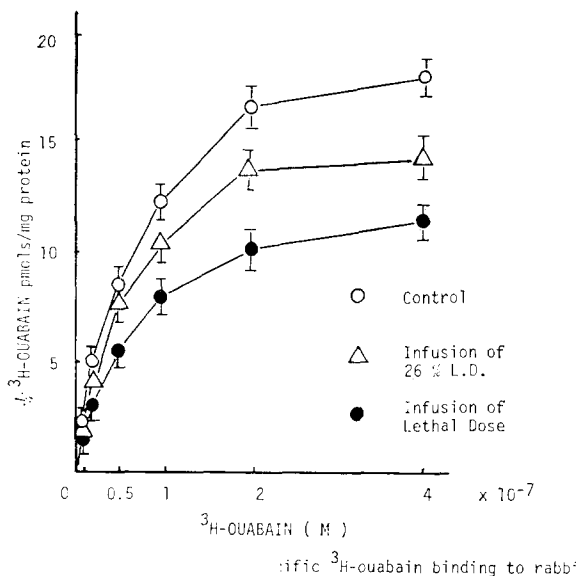


Fig. 3-Inhibition of the specific ^3H -ouabain binding to rabbit heart microsomal fraction following infusion of lethal and 26 percent of the lethal dose of ouabain.

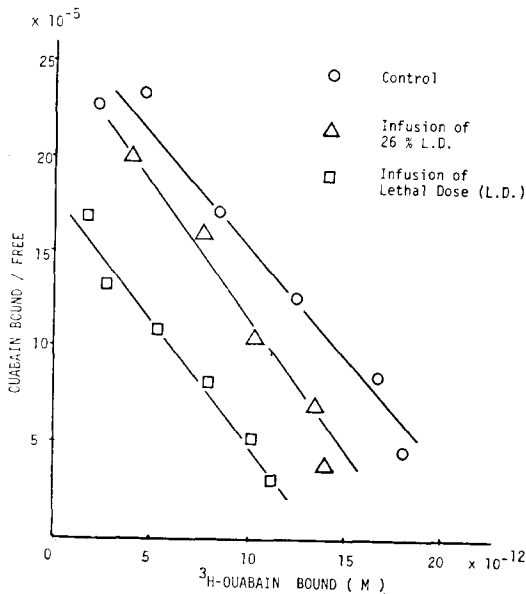


Fig. 4-Scatchard analysis of the inhibition of ^3H -ouabain binding to microsomal fraction by the infusion of ouabain.

ouabain 투여군은 4.33±0.31, 8.55±0.50, 12.05±0.47, 12.11±0.62, 12.67±0.84 pmol/mg protein이었으며, 치사량의 ouabain 투여군은 1.73±0.48, 5.05±0.56, 7.86±0.36, 8.91±0.41, 11.85±0.75 pmol/mg protein의 결합을 나타냈다(Fig. 5).

이들 각 경우 정상군에서의 B_{max} 값은 23.65±1.68 pmol/mg protein이고 26% 치사량의 ouabain 투여군은 18.59±1.66 pmol/mg protein이며 치사량의 ouabain군은 14.20±0.77 pmol/mg protein을 나타냈다. K_d값은 정상군 0.85±0.10×10⁻⁷M, 26% 치사량 투여군은 0.72±0.02×10⁻⁷M 및 치사량 투여군은 0.81±0.06×10⁻⁷M

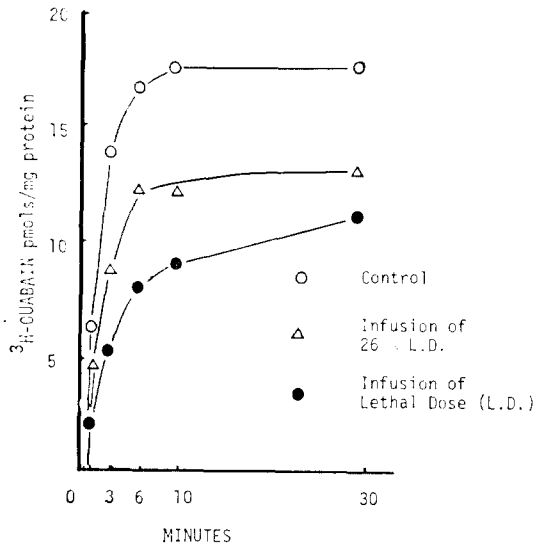


Fig. 5-Time course of binding of 0.4μM ³H-ouabain to microsomal fraction from rabbit heart following infusion of lethal and 26 percent of the lethal dose of ouabain.

Table II-Maximal binding sites concentration and K_D values after the treatment of ouabain.

Treatment	K _D value (×10 ⁻⁷ M)	B _{max} (pmol/mg protein)	No. of animals
Control	0.85±0.10 ^a	23.65±1.68	5
Infusion of 26% L.D.(30μg/kg)	0.72±0.02	18.59±1.66 ^b	3
Infusion of lethal dose(113μg/kg)	0.81±0.06	14.20±0.77 ^b	4

^a Values are mean±S.E., ^b Significantly different from corresponding control value (p<0.01).

이었다(Table II).

인삼 에탄올 엑기스 점적투여 후 ³H-ouabain 결합에 미치는 영향—인삼 에탄올 엑기스용액을 처음 10mg/kg 귀정맥으로 투여한 후 3.6mg/kg/min의 점적속도로 약 80분간 투여한 후 심장에서 분리한 마이크로솜 분획에서의 ³H-ouabain 결합을 관찰하였을 때 ³H-ouabain 각 농도에서 2.72±0.47, 4.44±0.39, 8.36±0.42, 12.26±0.25, 14.85±1.00, 17.21±0.92 pmol/mg protein의 결합을 보였다.

이 경우 K_d값은 0.69±0.06×10⁻⁷M이고 B_{max}값은 20.26±1.58 pmol/mg protein으로서 정상군보다 낮은 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다(Table III).

카페인을 점적투여한 후 ³H-ouabain 결합에 미치는 영향—카페인을 부하용량으로 3mg/kg 귀정맥으로 투여한 후 1.7mg/kg/min의 속도로 약 85분간 투여하여 적출심장에서 분리한 마이크로솜 분획에서의 ³H-ouabain 결합을 관찰하였을 때 ³H-ouabain 각 농도에서 2.10±0.20, 4.72±0.30, 8.62±0.29, 12.79±0.62, 16.80±0.92, 18.90±0.84 pmol/mg protein이었다. 이때 K_d값은 0.82±0.09×10⁻⁷M이었고 B_{max}값은 24.38±1.20 pmol/mg protein을 나타냈다(Table III).

Table III-Maximal binding sites concentration and K_D values after the treatment of ginseng and caffeine.

Treatment	K _D value (×10 ⁻⁷ M)	B _{max} (pmols/mg protein)	No. of animals
Control	0.85±0.10 ^a	23.65±1.68	5
Infusion of ginseng EtOH Ex.(300mg/kg)	0.69±0.06	20.26±1.58	4
Infusion of caffeine (150mg/kg)	0.82±0.09	24.38±1.20	3

^a Values are mean±S.E.

고 찰

심근의 혈장막에 존재하는 Na⁺, K⁺-ATPase 가 디기탈리스 배당체의 수용체로서 디기탈리스

배당체의 양성 변력 효과는 이 효소의 억제와 상관성이 있으며^{15,26)} *in vitro*에서 Na^+ , K^+ -ATPase에 대한 ouabain등의 결합은 잘 알려져 있다.⁵⁾ 또한 Dutta등⁷⁾은 ^3H -ouabain을 적출한 개의 심장이나 개 체내에 관류하였을 때 혈장막의 Na^+ , K^+ -ATPase 분획에 특이하게 축적됨을 관찰하였으며 아울러 Na^+ , K^+ -ATPase 활성이 정상군의 47%로 억제됨을 보고한 바 있다. 그러나 직접 토끼 정맥내에 ouabain을 투여한 후 ^3H -ouabain 결합 분석 방법으로 ouabain 결합부위가 점유되어 있음을 *in vitro*에서 확인한 보고는 없었으므로 저자들은 토끼정맥내에 ouabain을 관류한 후 혈장막을 분리하였을 때 ouabain이 계속 결합되어 있는지를 ouabain 결합분석 방법으로 확인하고자 하였으며 그 결합이 투여용량에 비례하는가를 검토하고자 하였다. 그 결과 ouabain의 치사량 투여군에서는 그 결합이 ouabain 비투여군에 비해서 약 60%임을 관찰함으로써 치사량투여로 ouabain 결합부위가 40% 점유되어 있음을 확인하였다. 26% 치사량 투여군에서는 ouabain 결합이 약 79%로서 ouabain 결합부위가 21%점유되어 있음을 관찰함으로써 투여약물에 비례하여 결합부위가 점유됨을 확인할 수 있었다. 한편 ouabain의 치사량과 26% 투여군의 ouabain 결합분석을 배양시간을 달리함으로써 ^3H -ouabain의 결합을 검토하였을 때 배양시간 10분경에 3군에서 모두 거의 포화됨을 관찰하고 또한 관류용량에 비례하여 ouabain 결합이 감소함을 관찰함으로써 정맥으로 투여한 ouabain에 의하여 효소의 결합부위가 점유되어 있음을 확인하였다.

따라서 여러 학자들의 주장과 같이 Na^+ , K^+ -ATPase의 억제와 ^3H -ouabain결합부위의 변화의 상관성은 약물에 대한 노출시간과 ouabain의 혈장중 농도에 의존함을 알 수 있었다. 한편 Dutta⁷⁾등의 실험에서 개에서의 치사용량은 총량 $76\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으나 본 토끼를 이용한 실험에서는 약 $113\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량에서 치사함으로써 치사량이 kg 당 49% 증가되었음을 관찰하였다. Dutta의 실험에서 억제효과는 대조군의 활성이 $16.2\mu\text{mol Pi}/\text{mg}/\text{hr}$ 이었고 치사량의 ouabain을 투여한 경

우는 $7.33\mu\text{mol Pi}/\text{mg}/\text{hr}$ 로 감소되었다. 본 실험에서는 대조군에 비해 약 60% 결합을 나타내므로써 ouabain에 대한 감도가 개에 비해 더 약하다는 것을 알 수 있었고 이는 기 문헌의 사실과도 일치하였다.

디기탈리스 핵에서와 같이 스테로이드 구조를 갖는 인삼성분에 의해 ouabain 결합에 변화를 초래하고 또한 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성도 억제한다는 보고가 있으나⁸⁾ 그 효과는 구조적 상관성에서 오는 경쟁적 결합인지 물리적 차단효과인지 혹은 세척효과인지는 불명하다. 본 실험에서 인삼 에탄올 엑기스 투여에 의한 영향은 단지 B_{max} 에서의 일부 감소 및 K_d 에서의 약간의 변화는 있었으나, 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성있는 차를 보이지 않았다. 따라서 인삼성분 중 Na^+ , K^+ -ATPase와 결합하는 성분이 있다하더라도 이는 ouabain과 같이 강한 결합은 아닐 것이며 침투방식도 다를 것이라는 가능성을 보여 주었다.

한편 ouabain 결합부위에 미치는 실험 보고가 없고 그 기전을 단지 Ca^{++} -triggered Ca^{++} 유리로만 해석되는 카페인의 경우 그 구조에서도 예견할 수 있듯이 ouabain 결합부위에 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다.

결 론

1. 토끼 귀정맥에 치사농도의 ouabain($113\mu\text{g}/\text{kg}$)과 26% 치사농도($30\mu\text{g}/\text{kg}$)의 ouabain을 관류한 후 심근 근섬유막 Na^+ , K^+ -ATPase 분획을 분리하여 *in vitro*에서 ^3H -ouabain 결합분석을 검토한 결과 치사농도군에서는 비투여군의 60%, 26% 치사농도군에서는 79%의 결합을 관찰하였다.

2. 양군의 근섬유막 분획에 대한 ^3H -ouabain 결합은 배양시간에 따라 증가하였으나 약 10분경에 포화되었으며, 관류농도에 따라 ouabain 결합량이 감소하였다.

3. 인삼 에탄올 엑기스 투여군(총투여량 $300\text{mg}/\text{kg}$)에서 ^3H -ouabain결합 분석 결과 K_d 값 및 B_{max} 가 비투여군에 비해 다소 감소하는 경향

이 있었으나 유의성있는 변화를 인정할 수 없었다.

4. 카페인 투여군(총투여량 150mg/kg)에서는 ouabain 결합부위에 영향이 없었다.

1986년도 서울대학교 병원 임상연구비 보조로 이루어진 것임.

문 헌

- 1) Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem Biophys. Acta.* **23**, 394 (1957).
- 2) Adams, R.J., Schwartz, A., Grupp, G., and Wallick, E.T.: High-affinity ouabain binding site and low dose positive inotropic effect in rat myocardium. *Nature*, **296**, 167 (1982).
- 3) Lane, L.K., Copenhaver J.H., and Schwartz, A.: Purification and characterization of the [^3H]-ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.* **248**, 7197 (1973).
- 4) Wallick, E.T., Pitts, B.R., and Schwartz, A.: A kinetic comparison of cardiac glycoside interactions with Na^+ , K^+ -ATPase from skeletal and cardiac muscle and from kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **202**, 442 (1980).
- 5) Matsui, H. and Schwartz, A.: ATP-dependent binding of ^3H -digoxin to a Na^+ , K^+ -ATPase from cardiac muscle. *Fed. Proc.* **26**, 398 (1967).
- 6) Allen, J.C., Martinez, M., and Schwartz, A.: Relation between digitalis binding *in vivo* and inhibition of sodium, potassium adenosine triphosphatase in canine kidney. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 77 (1971).
- 7) Dutta, S., Rhee H.M., and Marks, B.H.: *Myocardial Biology*, **4**, 118 (1972).
- 8) Lee, S.W., Lee, J.S. and Jin, K.D.: Effect of ginseng saponin on the activity, phosphorylation, [^3H] ouabain binding of purified Na^+ , K^+ -ATPase isolated from the outer medulla of sheep kidney. *Yakhak Hoeji*, **29**, 76 (1985).
- 9) Lim, J.E. and Kim, N. D.: Seoul Nat'l Univ., *Vol. 30, No. 3, 1986* (1932).
- 10) Shimada, K. and Yazaki, Y.: *Jap. Heart J.* **19**, 754 (1978).
- 11) Pitts, B.J., Wallick, E.T., Allen, J.C., and Schwartz, A.: On the lack of inotropy of cardiac glycosides on skeletal muscle: A comparison of Na^+ , K^+ -ATPase from skeletal and cardiac muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 431 (1977).
- 12) Vander Tuig, J.G., Flynn, A.M., Romos, D.R.: Ventromedial hypothalamic lesions reduce the number of Na^+ , K^+ -ATPase enzyme units in skeletal muscle of weanling rats. *Proced. Exper. Biol. Med.* **167**, 475 (1981).
- 13) Pitts, B.J.R., and Schwartz, A.: Improved purification and partial characterization of (Na^+ , K^+)-ATPase from cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* **401**, 184 (1975).
- 14) Vyskocil, F., Teisinger, J., and Dlouha, H.: The disparity between effects of vanadate (V) and vanadyl (IV) ions on (Na^+ , K^+)-ATPase and K^+ -phosphatase in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **100**, 982 (1981).
- 15) Lee, C.Y., Akera, T., Stollman, S., and Broy, T.: Saturable binding of dihydromorphine and naloxone to rat brain tissue *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **194**, 583 (1975).
- 16) Kim, N.D., Bailey L.E., Dresel, D.E.: Correlation of the subcellular distribution of digoxin with the positive inotropic effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**, 377 (1972).
- 17) Asano, Y.A., Lbierman, U.A., and Edelman, I.S.: Thyroid. thermogenesis. Relationships between Na^+ -dependent respiration and Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **57**, 368 (1976).
- 18) Matsui, H., and Schwartz, A.; Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na^+ , K^+)-dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Acta.* **151**, 655 (1968).
- 19) Wilkinson, N.: Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**, 324 (1961).
- 20) Akera, T., and Cheng, V.J.K.: A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor studies. *Biochem. Biop-*

- hys. Acta.* **470**, 412 (1977).
- 21) Gerthoffer, W.T., and Allen, J.C.: Characteristics of binding of [^3H] ouabain to smooth muscle sodium potassium adenosine triphosphatase and quantitation of sodium potassium pump sites. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **217**, 692 (1981).
- 22) Tobin, T., and Sen, A.K.: Stability and ligand sensitivity of [^3H]-ouabain binding to (Na^+ , K^+)-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* **198**, 120 (1970).
- 23) Wehling, M., Schwartz, A., Whitmer, K. and Wallick, E.T.: Interaction of chlormadinone acetate with the ouabain binding site of Na^+ , K^+ -ATPase. *Molecul. Pharmacol.* **20**, 551 (1981).
- 24) Schwartz, A., Linder Mayer, G.E., and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Reviews*, **27**, 4 (1975).
- 25) Matsui, H. and Schwartz, A.: Purification and properties of a highly active ouabain sensitive Na^+ , K^+ -dependent adenosine-triphosphatase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Acta.* **128**, 380 (1966).
- 26) Besch, H.R., Allen, T.C., and Schwartz, A.: Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme system from canine myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **171**, 1 (1970).