大韓胸部外科學會誌 第25卷 第4號
Vol. 25, No. 4, April, 1992

골격근 망상체 Ca^{2+}유리 Channel(Ryanodine receptor)의 Mg^{2+}에 의한 유리 억제

이 철 주*

-Abstract-

Inhibitory Effect of Mg^{2+} on the Release of Ca^{2+} from Ryanodine Receptor of the Sarcoplasmic Reticulum in the Skeletal Muscle

Cheol Joo Lee, M.D.*

The precise mechanism of the Excitation-Contraction Coupling is still uncertain. But the concept that Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) from the Ryanodine receptor in the sarcoplasmic reticulm (Foot structure) may play a major role in E-C coupling has been widely accepted since 1970's. It is believed that increased cytosolic Ca^{2+} followed by CICR is main contributor for E-C coupling of striated muscle.

Resulting phenomena of ischemic/post-reperfusion myocyte is increased cytosolic Ca^{2+}, even to the absence of Ca^{2+} in reperfusate. So intracellular inhibitor to CICR might prevent the ischemic and reperfusion damage of myocardial cells.

The relatively purified foot protein, especially heavy sarcoplasmic reticulum rich, of the skeletal muscle was incorporated into the black lipid bilayer (Phosphatidyl ethanolamine : Phosphatidyl serine=1 : 1). Under the steady state of membrane potential (+20 mV), ionic current through Ryanodine receptor was measured with Cs^+ as charge carrier. In the cis chamber (Cytoplasmic side), Mg^{2+} strongly inhibited CICR of Ryanodine receptor(K_d=6.2 nM).

In conclusion, naturally existing intracellular free Mg^{2+} can inhibit CICR from intracellular Ca^{2+} reservior (heavy SR). So post-ischemic or post-reperfusing myocardium could be preserved using additional free Mg^{2+} in cardioplegic solution or reperfusate, otherwise the optimal concentration is undetermined.

서 론

1953년 John Gibbon에[19] 의해 체외순환을 이용한 개심술이 도입되고 근래에 이르러 개심술은 보편화 되고 있다. 그러나 개심술 혹은 관상동맥우회술 후에 발생하는 허혈성 심근손상과 재관류성 심근손상은 아직도 수술후의 사망율과 유병율에 결정적인 영향을 미치고 있다[18]. 근육의 수축과 이완에 대한 기전이 아직도 명확히 밝혀져 있지 않을 뿐 아니라 또한 심근 혹은 골격근의 허혈성 또는 재관류성 손상에 관한 기전도 밝혀져 있지 않다[3,7,8,9,13,15].

심근허혈시나 재관류손상시 Ca^{2+}이 전혀 없는 관류

*인하대학교 의과대학 흉부외과학교실
*Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Inha University Hospital
**본 연구는 1991년도 추계 학술대회에서 구연하였음

액 하에서도 Calcium Paradox 현상이 생기는 것을 보아 세포질내의 Ca^{2+}저장소인 망상체가 근육의 수축-이완이나 허혈성 손상에 중요한 한 요소가 됨을 알 수 있다[10].

Mg^{2+}은 세포내에 0.2 mM정도의 자유 이온 상태로 존재하면서 [1,30] 여러 대사과정에 효소의 촉진 혹은 억제제로 작용하여 세포의 생존에 중요한 역할을 한다. 또한 망상체 Ryanodine rwceptor의 억제제로 작용한다고 알려져 있다[12,23,33,34]. 최근 많은 기관들이 심정지액이나 재관류액에 Mg^{2+}을 첨가하여 좋은 동물실험 결과나 임상실험 결과를 보고하고 있으나 그 작용기전 등의 자세한 증거는 알려져 있지 않다[10,17,18] 이에 저자는 다양한 망상체 Ryanodine receptor 억제제중 근육세포의 허혈성 혹은 재관류성 손상을 억제할 수 있다고 알려진 Mg^{2+}이 실제 횡문근 망상체의 Ryanodine receptor의 활성도에 어떻게 작용하는지를 알아보고자 골격근의 망상체의 Ryanodine receptor를 분리하여 인공 이중지질막에 재조합한 후 전기생리학적인 실험을 하여 Mg^{2+}의 심근보호 효능을 이론적으로 유추하고자 한다.

연구방법

1. Ryanodine receptor의 분리

Differential sucrose gradient법으로 분리된 골격근 망상체는 Light SR과 Heavy SR의 두 부분으로 나뉘는데 본실험에서 사용코자 하는 Ryanodine receptor(Ryd R, RR)는 방사성 동위원소 검사에 의하면 Heavy SR에서만 볼 수 있다. 1988년 Mitchell등과 Fill 등에[14,28] 의해 개발된 분리방법을 약간 변형하여 New Zealand Rabbit의 골격근을 사용하였다. 요약하면 Pentobarbital sodium으로 토끼를 마취한 후 사망을 확인하였으며, 후하지의 근육을 채취하여 액체 질소에 급속냉동하여 영하 80도에 보관하였다. 냉동된 근육 250-300gm을 취하여 잘게 절편시킨후 Food processor(Cousinart^{R})로 분쇄시킨다. 40-50gm씩 나누어 300 ml의 균질용액(Homogenizing solution ; 0.3M sucrose, 0.5 mM EGTA, 20 mM $Na_4P_2O_7$, 20 mM NaH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.1)과 섞은후 Waring blender를 사용하여 균질화하였다. 균질화시 단백분해효소 억제제(1μM Pepsstatin A, 1 mM Iodoacetamide, 0.1 mM PMSF, 1μM Leupeptin, and 1 mM Benzamidine)를 첨가하였다. 균질화된 시료를 Sorval rotor를 사용하여 9,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 그 상등액을 취한다. 4겹의 면거즈를 통해 걸러낸 후, 같은 분리기에서 14,000rpm으로 30분간 원심분리하여 그 침전물을 취한다. 침전물에 60 ml의 균질화액을 첨가하여 서로 비중이 다른 sucrose용액의 상단에 다음과 같은 비율로 배분한다. 7 ml의 27% sucrose in homogenizing solution(HS), 7ml의 32% sucrose in HS, 그리고 14 ml의 38% sucrose in HS. 이상의 혼합액을 Beckman SW 28 rotor를 사용하여 섭씨 4도하에 16시간동안 20,000 rpm으로 초원심분리한다. Ryanodine receptor가 풍부한 Heavy SR은 32%와 38%의 sucrose 경계부에 분리되어 침전되므로 이 부분만 선택적으로 수집한다. sucrose가 없는 HS로 침전물의 약 3배가 될때까지 희석시킨 후 Beckamn 35 rotor를 이용하여 30분간 30,000 rpm에서 추원심분리한다. 최종의 침전물을 재용해액(0.3 sucrose, 0.1M KCl, 5 mM Na-PEPES, pH 6.8)에 용해시켜 영하 80도에서 보관하였다가 실험시 녹여서 사용한다.

2. 실험용액 및 전기생리학적 측정

모든 실험은 cis chamber(Ryanodine receptor를 첨가하는 쪽)을 500 mM CsCl, 10 mM HEPES, pH 7.4로 하고 반대쪽의 trans chamber를 50 mM CsCl, 10 mM HEPES, pH 7.4로 하였다. 즉, trans쪽이 망상체의 내부가 되도록 하였다. Cs^{+}을 전기부하체(charge carrier)로 사용한 것은 1) Ca^{2+} channel에 대한 전도도가 Na^{+}이나 Ca^{2+}보다 높아(gcs /gca=2) 실험시 전류/잡음의 비가 높고, 2) 따라서 원하는 전류의 크기를 얻기 위해 고농도의 Ca^{2+}을 사용하지 않아도 된다. 고농도의 Ca^{2+} 자체가 Ryanodine receptor의 활성도를 변화시키기 때문이다. 3) Cs^{+}이 K^{+} channel을 억제하기 때문에 불필요한 잡음을 제거할 수 있기 때문이다[14,32,33] 실험에 사용된 모든 2가 양이온들은 영국의 Johnson Mattey Chemicals 회사의 순수 정제된 것을 사용하였을때, 자유 이온의 농도는 Fabiato가[11,12,13] 개발한 공식을 컴퓨터를 이용하여 계산하였다.

인공 이중지질막에 사용될 지질은 미국의 Avanti Polar Lipid회사의 소의 뇌에서 정제한 Phosphatidyethanolamine(PE)과 Phosphatidylserine

(PS)을 사용하였다. PE와 PS를 무게비로 1 : 1이 되도록 혼합한 후에 약한 질소공기하에서 건조시킨다. 건조된 지질을 미국 Aldrich Chemical사의 순수한 n-Decane에 20mg /ml의 최종농도에 재용해시켜 사용한다.

channel의 재조합은 1986년 Coronado 등이[6,32] 확립한 방법을 이용하였다. 두개의 chamber를 이용할 수 있는 PVC block에 polycarbonate(Lexan^R)이나 Derlin재질의 작은 용기를 제작하여 사용하였으며 그 중간에 직경이 300−350μm되는 구멍을 박부 정중부에 뚫었다(그림 1). 양쪽 용기에 각각의 용액을 충진시킨 후 cis용기에 10−20μg의 분리된 Ryanodine receptor rich heavy SR단백질을 첨가하여 약 60초간 혼합시킨다. 적절한 조건하에서 channel의 재조합은 수분내에 일어나며 그렇지 않으면 위와 같은 과정을 되풀이 한다(그림 2). 보통 Cl^- channel이 먼저 융합되나 본 실험 조건하에서는 Cs^+과 Cl^-의 역위전압(Reversal potential)이 각기 −59 mV와 +30 mV이기 때문에 쉽게 구별할 수 있다. 기초전류의 측정은 Cl^- channel의 간섭을 방지하기 위해 +20 mV에서 하였다.

전류의 측정은 Agar gel을 입힌 염소화 시킨 은선(silver wire)를 전극으로 사용하였다. 서독의 List Elcetronic DA-Eberstadt사 제품인 List L/M EPC 7전류 증폭기를 cis용기의 전극에 연결하여 사용하였고, trans용기는 접지하였다. 전류는 미국 Frequency Devices사의 Low-pass Bessel filter를 통해 1 kHz의 속도로 걸렀으며, 미국의 Medical Systems Corporation사의 PCM-1 VCR-Instrumentation Adaptor를 이용하여 16 kHz의 속도로 Digitize 시켜 VCR 영상녹화재생기에 수록하여 분석에 사용했다.

수록된 결과를 미국 Axon Instrument Inclination 사의 Axotape이라는 software를 사용 2−10kHz로 추출하여 같은 회사의 PCLAMP version 5.5로 분석하였다.

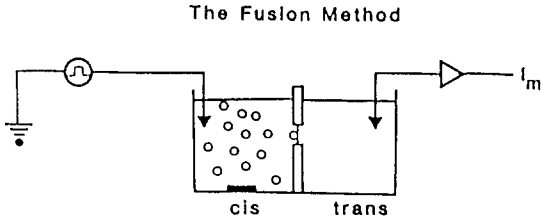

그림 1. Channel단백의 재조합을 위한 용기−단백질(O)을 첨가하는 쪽이 cis side(세포질 쪽)이 되고 반대쪽이 trans side(SR 내부)가 된다.

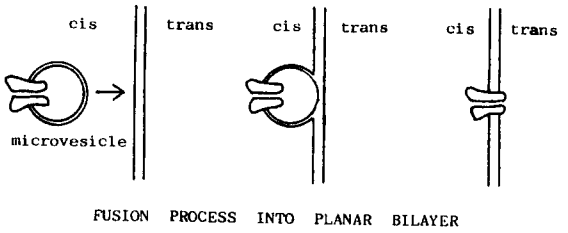

그림 2. Channel단백을 가진 microvesicle이 인공 이중지질막에 재조합되어 두개의 이중 지질막이 한개의 이중지질막으로 되는 과정을 보이고 있다.

결 과

1. Ryanodine receptor(RR)의 기본 전기생리학적 특성

RR의 개방확률(Open probability)는 세포질내의 자유Ca^{2+} 농도에 따라 이중적인 반응을 보인다. 그림 3과 4에서 보는 바와 같이 세포질 쪽의 Ca^{2+} 농도를 10^{-9}에서 10^{-3}M까지 변화시키니 $10^{-7}-10^{-5}$M 사이에서 높은 개방을 보이고 10^{-6}M에서 가장 높은 개방 확률을 보인다. 아주 적은 농도나 높은 농도의 Ca^{2+}에서는 오히려 channel의 개방이 억제되는 Bimodal inactivation의 양상을 볼 수 있다. 각기 다른 막전위에서

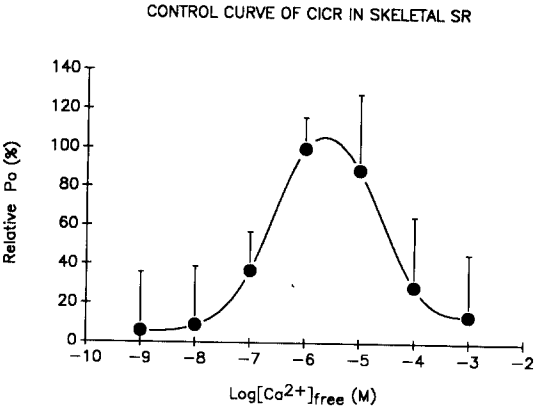

그림 3. 기초상태의 CICR-cis용기의 $[Ca^{2+}]$을 10^{-9}M에서 10^{-3}M까지 증가시켰을 때의 각 농도에서 channel이 개방되는 확률을 $[Ca^{2+}]=10^{-6}$M일 때를 100%로 하여 상대값을 그래프화 하였다.

channel의 개방되는 모양을 기록하여(그림 5) 전류-전위관계(Current-Voltage relationship)을 그려보니 역위전압이 -54 mV로서 이론적인 RR의 Ca^{2+} channel에 일치함을 알 수 있었고, 각 전위별 개방을 보면 강한 막전위의존성(Voltage dependence)를 관찰할 수 있었다(그림 6) RR의 Cs^{+}에 대한 전도도(conductance)는 비대칭성 용액하에서 615 pS으로 아주 높은 전도도를 보였다(그림 6).

지금까지 알려진 RR의 표식자로 Ryanodine과 ATP(Adenosine triphosphate)는 channel의 개방을 항진시키고 Ruthenium red와 Mg^{2+}은 channel의 개방을 억제한다고 한다[6,14,23,25,26,31,33] 본실험시에 재조합된 channel이 과연 RR인지를 확인하기 위해 위에 말한 표식자들을 cis용기에 첨가하여 그 변화를 관찰하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 5 mM의 MgATP를 첨가하니 channel의 개방이 5-20배 증가함을 알 수 있었고, 그림 8에서는 10μM의 Ryanodine을 첨가했을 때 전류의 크기는 작아지나 channel의 개방은 월등히 증가함을 볼 수 있었다. 1 mM의 Mg^{2+}을 첨가하거나 (그림 9) 1μM의 Ruthenium red를 첨가하니(그림 10) channel의 개방은 현저하게 감소하였다. 이상의 결과를 토대로 본실험에 재조합된 channel은 RR에 있는 Ca^{2+} releasing channel임을 단정할 수 있다.

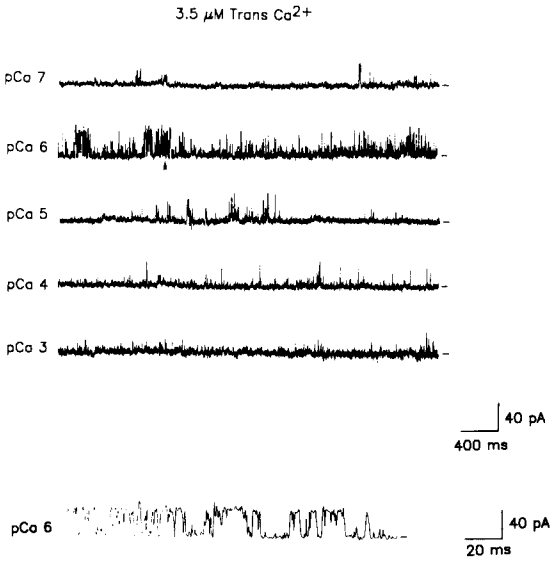

그림 4. 실제 RR-channel을 통항 전류의 흐름을 기록한 것으로 하단의 기록은 Time scale을 확대했을 때의 기록이다. 우측단의 짧은 사선이 channel이 닫혔을 때를 가리킨다.

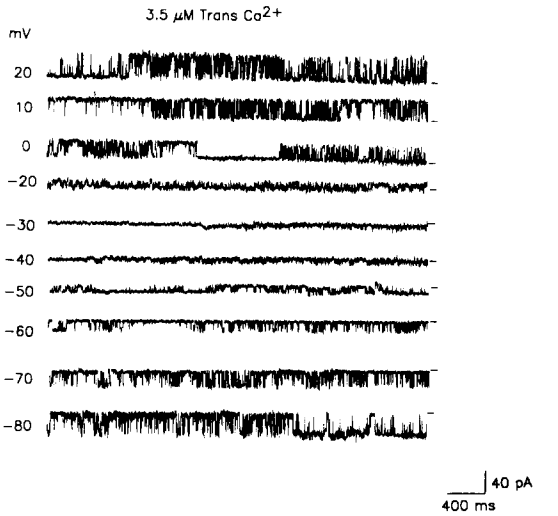

그림 5. 막전위에 따른 RR-channel의 실제기록-막전위를 -80 mV에서 점진적으로 +20 mV까지 탈분극화 시켰다. 이론적인 역위전압(-59 mV)와 실제 기록이 차이가 나는 것은 반복되는 실험동안 양측 용기 사이에 이온의 흐름이 있기 때문이다. 우측단의 짧은 사선이 channel이 닫혔을 때를 가리킨다.

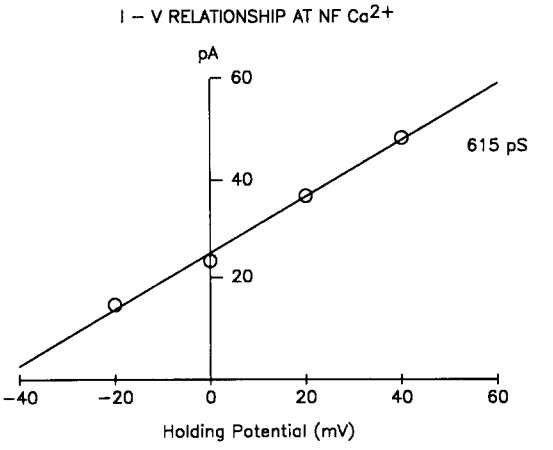

그림 6. Current-Voltage Relationship-각기 다른 막전위에서의 전류의 크기를 그래프화 하였다. 500 mV Cs^{+} in cis 와 500 mV Cs^{+} intrans의 비대칭하에서 615 pS의 Unitary conductance를 보였다.

2. Mg^{2+}에 의한 RR의 CICR억제에 관한 결과

세포질내의 1 mM의 자유 Mg^{2+}이 RR channel의 CICR 활성도가 어떻게 변하는가를 알아보았다. 그림 11에서 보는 바와 같이 기초 CICR의 양상에 현저히

그림 7. 5 mM의 MgATP를 cis용기에 첨가하니 현저하게 channel의 개방이 증가하였다. 우측단의 짧은 사선이 channel의 폐쇄상태이다.

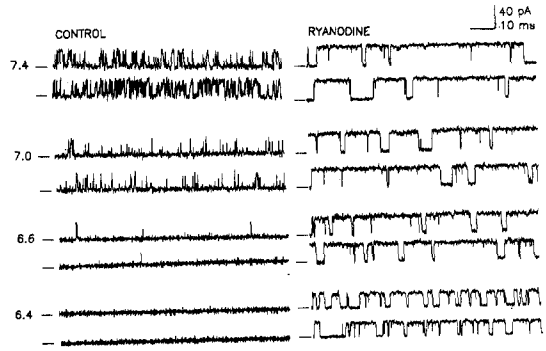

그림 8. 기초상태(좌측의 기록)와 10 uM의 Ryanodine을 첨가했을 때(우측의 기록)의 각기 다른 pH에서의 기록이다. Ryanodine을 첨가하니 전류의 크기는 감소하나 channel의 개방확률은 현저히 증가한다. 좌측단의 짧은 사선이 channel의 폐쇄상태이다.

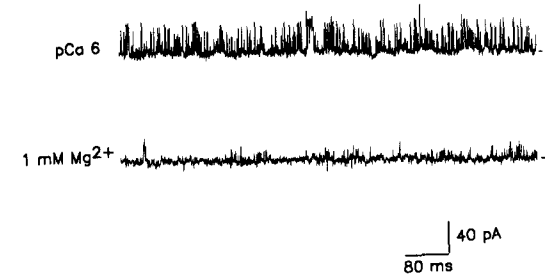

그림 9. 1mM의 Mg^{2+}을 cis용기에 첨가하니 channel의 개방이 현저하게 감소한다. 우측단의 짧은 사선이 폐쇄상태이다.

억제효과를 보이는데, 특이한 것은 RR의 자연 CICR, 즉 저농도와 고농도에서의 낮은 개방확률을 공히 억제하고 있다는 것이다. 세포질내의 Ca^{2+}이 10^{-9}M 이하에서는 불활성화되어 있다가 Ca^{2+}의 농도가 증가함에 따라 channel이 활성화되면서 개방이 증가되고 Ca^{2+}이 10^{-5}M이 넘어가면 오히려 channel이 다시 불활성화하는데 Mg^{2+}은 channel의 Ca^{2+}에 의한 활성화(Activation)와 불활성화(Inactivation)을 공히 억제함을 알 수 있다. 일반적으로 이가 금속이온들은 Ca^{2+}

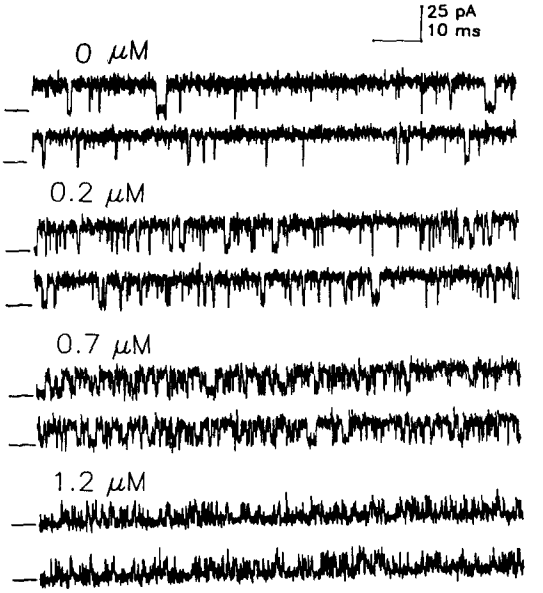

그림 10. cis용기에 Ruthenium red를 0μM에서부터 1.2μM까지 증가시키니 channel의 현저히 감소한다. 좌측단의 짧은 사선이 폐쇄상태이다.

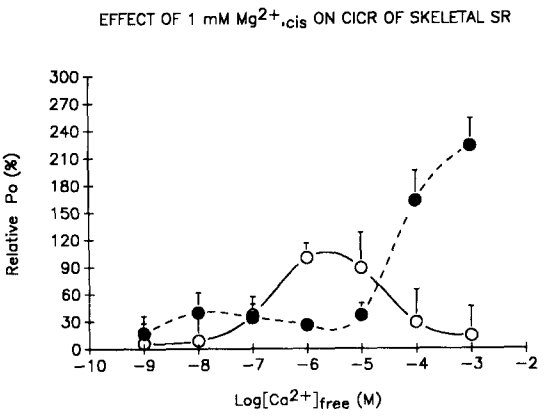

그림 11. cis용기의 $[Ca^{2+}]$을 증가시키면서 1mM의 Mg^{2+}을 첨가하니 CICR이 활성화되는 것과 불활성화되는 과정을 공히 억제하는 것을 볼 수 있다. (o) : Basal CICR(o) : 1 mM Mg^{2+} in cis side 각각의 개방률은 Ca^{2+}의 농도가 10^{-6}M일때를 100%로 값을 표준화하였다.

channel을 선택적 혹은 비특이성으로 억제하는데 channel protein의 방향에 따른 비대칭성 억제를 보인다. 그림 12에서 보는 바와 같이 cis용기와(그림 상단) trans용기에서(그림 하단) 각 이가이온의 억제도는 현격한 차이를 보이는데 cis쪽 즉 세포질에 면한 자유 Mg^{2+}이 가장 예민하게 CICR을 억제함을 관찰할 수 있었다. (K_d=6.2 nM) Mg^{2+}의 억제유형을 보기 위해 Hill coefficient를 구해보니 0.16으로서 적어도 분자대 분자가 1:1로 억제함을 추정할 수 있다(그림 13).

고 안

근육의 수축-이완의 정확한 기전이 아직은 밝혀지지 않고 있으나 최근까지 받아들여지는 개념에 의하면, 신경계의 흥분이 근세포막에 전달되면 세포막의 막전위가 이어서 탈분극화하고 이에 따라 세포막에 분포하고 있는 Ca^{2+} channel (Dihydropyridine receptor, DHP receptor, L-type Ca^{2+} channel)가 열리고 이 channel을 통해 세포외액의 Ca^{2+}이 세포내로 유입이 된다[20]. 이렇게 유입된 Ca^{2+}이 세포내 Ca^{2+} 저장소인 Sarcoplasmic Reticulum (SR, 망상체)으로부터 Ryanodine receptor를 통하여 일시에 Ca^{2+}을 유리시켜 근육이 수축하기에 충분한 세포질내의 Ca^{2+} 농도에 도달하게 한다. 이렇게 증가된 Ca^{2+}이 Troponin C에 붙여 Tropomyosin이 억제하고 있던 Myosin의 Actin 연결부위를 분리시켜 Actin과 Myosin이 교차하게 함으로서 근육의 수축이 일어난다. 한편 근육의 이완은 미토콘드리아에서 유산소성 인산화과정에 의해 생성된 ATP가 ADP로 가수분해될 때 발생한 인산기의 에너지로 Tropomyosin이 원래의 위치로 돌라가면서 Ca^{2+}을 Troponin C와 분리시켜 일어난다. 이렇게 재유리된 Ca^{2+}의 대부분은 망상체막의 Ca-ATPase에 의해 재흡수되고, 세포외액으로부터 들어왔던 일부의 Ca^{2+}은 세포막에 존재하는 Ca-ATPase와 Na^+-Ca^{2+} exchange pump에 의해 재방출 된다[7,8,9,11,13,15].

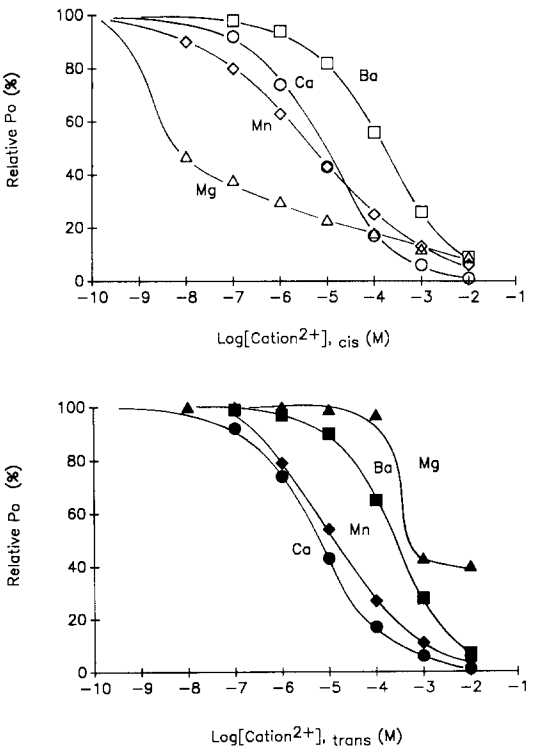

그림 12. cis와 trans용기의 $[Ca^{2+}]$을 3.5 μM로 유지하고 이가 양이온들의 농도를 변화시켰을 때의 개방확률(표준화한 값)을 그래프화 하였다. 상단이 이가양이온을 cis용기에 첨가했을 때이고 하단이 trans용기이다.

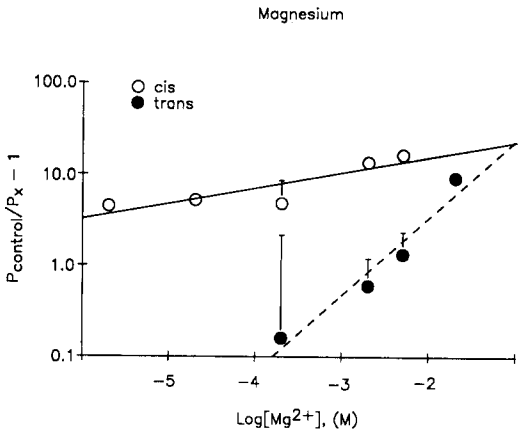

그림 13. Hill plot-cis용기에 Mg^{2+}의 농도를 증가시켰을 때 Hill equation에 의한 그래프이다. Hill값이 각각 0.16(cis side)과 0.86(trans side)으로 공히 Ca^{2+}과 1:1로 경쟁적 억제를 함을 알 수 있다.

본 실험에서 보는 바와 같이 세포질내의 Ca^{2+}의 농도가 micromole이하에서는 SR로부터 CICR이 일어나지 않고 micromole의 농도가 되면 CICR이 최대로 일어나며 그 Threshold는 10^{-7}M이다. 보다 높은 농동에서는 오히려 억제되는 양상을 보인다. 이는 종래에 Endo등과[8] Fabiato & Fabiato 등이[11,13] 박피한 골격

근 세포와 심근세포에서 행하였던 실험들과 같은 결과이며, 허혈성 심근손상이나 재관류시의 심근손상시에 증가를 초래하는 Ca^{2+}의 근원을 추정할 수 있게 한다.

Endo등은[9] SR에서의 CICR이 심근세포에서는 근육수축의 주된 요소지만 골격근에서는 일부만 작용한다고 보고하고 있으나, Frank는[15] 골격근에서도 CICR이 근육의 수축-이완 기전에 주된 요소임을 밝히고 있다.

세포막의 DHP receptor나 SR의 Ryanodine receptor에 관한 형태학적인 관찰은 이미 1970년부터 Franzini-Armstrong등에 의해 밝혀져 있으며, 전기생리학적인 특성도 잘 알려져 있다[2,4,16,22,24,25,31,32,33] 1987년 Imagawa는 RR의 분자생물학적 구조를 밝혔고 이후 유전공학적 재조합에 의한 형태학적, 생리학적인 연구가 진행되고 있다[21].

RR의 순수 분리정제는 이미 잘 알려져 있으며 이 분리된 RR을 인공이중지질막에 재조합시키면 그 전기생리학적인 특성이 자연상태의 RR과 일치함을 1988년 Lai등이 보고하였다[5,22,27]. 본 실험에서 사용한 방법도 유사하고 그 결과가 일치함을 보았다.

한편 허혈성 근육손상이나 재관류성 손상의 기전에 관한 많은 추정들이 있고 그에 대한 예방이나 처치에 관한 시도들이 계속되어 왔지만 이 역시 명확한 설명이 되지 않고 있다. 다만 결과적으로 나타나는 근세포의 Ca^{2+} 증가와 고에너지 인산의 결핍 및 비산소성대사에 따른 세포내의 산성화에 따른 수종의 이온들의 유입에 의한 세포부종등에 의한 세포기능의 저하 내지는 세포괴사가 여러 부작용을 초래한다고 알려져 있다[18]. 이런 근거하에 세포막이나 SR에서의 Ca^{2+}의 흐름을 억제할 수 있는 제제들에 대한 연구들이 진행되었고, 그중 유력한 것이 세포내액이나 세포외액에 자연존재하고 있는 Mg^{2+}에 관한 연구이다. 알려진대로 Mg^{2+}이 세포막의 DHP receptor에 억제제로 작용하고 있고[12,17,23,34], 본실험에서 보는바와 같이 SR에서의 Ca^{2+}의 유리를 억제하고 있다. Geffin등은[18] Mg^{2+}이 심근정지액에 첨가되었을 때 위와 같은 작용 이외에도 Mitochondria에서의 산소성인산화를 항진시켜 ATP의 생산을 증가시키고 또한 SR의 Ca-ATPase기능을 항진시켜 Ca^{2+} 재흡수를 촉진시킨다고 보고하고 있다. 본 실험에서 보는 바와 같이 세포질쪽의 자유 Mg^{2+}은 다른 이가이온들에 비하여 아주 높은 억제효과를 같는 반면 SR 내부쪽은 그 영향이 다른 이가이온들보다 오히려 낮은 것을 알 수 있다. 즉 심근관류액을 통해 세포질 내부로 유입된 Mg^{2+}이 효과적으로 CICR을 억제하여 허혈성 심근손상이나 재관류성 심근손상에서의 Ca^{2+}을 예방할 수 있으리라 추정할 수 있다.

결론적으로 요약하면 분리정제된 골격근의 RR을 인공 이중지질막에 재조합하여 그 전기생리학적인 특성을 관찰하니 다른 기관에서의 결과와 일치하였고, CICR이 근육의 수축-이완 기전의 중요한 역할을 함을 추정할 수 있었다. RR에서의 CICR을 억제한다고 알려진 Mg^{2+}을 첨가하니 세포질쪽에서 강한 억제효과가 있었다. 이는 Mg^{2+}을 관류액에 첨가하여 근육의 허혈성 손상이나 재관류성 손상시 일어나는 근육세포내의 현저한 Ca^{2+}의 축적을 예방할 수 있다는 이론적 근거가 되리라고 사료된다.

***본 연구를 하는데 시설이용 및 많은 도움을 주신 University of wisconsin Medical School의 생리학 교수이신 Dr. Roberto Coronado께 깊은 감사를 드린다.

REFERENCES

1. Alvarez-Leefmans FJ, Giraldez F, Gamino SM : *Intracellular free magnesium in excitable cells : its measurement and its biologic significance. Can J Physiol Pharmacol 65 : 915, 1987*
2. Anderson K, Lai FA, Liu Q, Rousseau E, Erickson HP, Meissner G : *Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca^{2+} release channel complex. J Biol Chem 264 : 1329, 1989*
3. Beuckelmann DJ, Wier WG : *Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. J Physiol 405 : 1988*
4. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C : *Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. J Cell Biol 107 : 2587, 1988*
5. Chamberlain BK, Volpe P, Fleischner S : *Calcium induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicle. J Biol Chem 259 : 7540, 1984*
6. Coronado R, Kawano S, Lee CJ, Valdivia C,

Valdivia C, Valdivia HH : *Planar lipid bilayer recording of ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum. Methos Enzymol(Submitted)*

7. Ebashi S : *Excitation-Contraction coupling. Ann Rev Physiol 38 : 293, 1976*
8. Endo M, Tanaka M, Ogawa Y : *Calcium induced calcium release from sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. Nature 228 : 34, 1970*
9. Endo M : *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev 57 : 71, 1977*
10. Engelman RM, Rousou JH, Lemeshow S, Dobbs WA : *A clinical comparison of potassium and magnesium-potassium crystaloid cardioplegia ; metabolic considerations. J Cardiovasc Surg 26 : 343, 1985*
11. Fabiato A, Fabiato F : *Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. J Physiol 249 : 469, 1975*
12. Fabiato A, Fabiato F : *Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. J Physiol 249 : 497, 1975*
13. Fabiato A : *Calcium induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol C : 1, 1983*
14. Fill M, Coronado R : *Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. Tre Neurosci 11 : 453, 1988*
15. Frank GB : *The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. Biochem Pharma 29 : 2399, 1980*
16. Franzini-Armstrong C : *studies if the triad. Ⅲ. Structure of the junction in fast twitch fibers. Tissue & Cell 4(3) : 469, 1972*
17. Garfinkel LG, Altschuld, Garfinkel D : *Magnesium in cardiac energy metabolism. J Mol Cell Cardiol 18 : 1003, 1986*
18. Geffin GA, Love TR, Hendren WG, et al : *The effects of calcium and magnesium in hyperkalemic cardioplegic solutions on myocardial preservation. J Thorac Cardiovasc Surg 98 : 239, 1989*
19. Gibbon JH Jr. : *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. Minnesota Med 37 : 171, 1954*
20. Hagiwara S, Byerly L : *Calcium channel. Ann Rev Neurosci 4 : 69, 1981*
21. Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP : *Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+}-permeable pore of the calcium release channel. J Biol Chem 262 : 16636, 1987*
22. Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu Q, Meissner G : *Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature 331 : 315, 1988*
23. Lansman JB, Hess P, Tsien RW : *Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+}, Mg^{2+} and Ca^{2+}. J Gen Physiol 88 : 321, 1986*
24. Liu Q, Lai A, Rousseau E, Jones RV, Meissner G : *Multiple conductance state of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulm. Biophy J 55 : 415, 1989*
25. Meissner G : *Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. J Biol Chem 259 : 2365, 1984*
26. Meissner G, Darling E, Eveleth J : *Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+}, Mg^{2+}, and adenine nucleotides. Biochem 25 : 236, 1986*
27. Miller C, Racker E : *Ca^{2+}-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. J Memb Biol 30 : 283, 1976*
28. Mitchell RD, Palade P, Saito A, Fleischner S : *Isolation of triads from skeletal muscle. Methods Enzymol 159 : 51, 1988*
29. Reynolds TR, Geffin GA, Titus JS et al : *Myocardial preservation related to magnesium content of hyperkalemic cardioplegic solution at 8°C. Ann Thorac Surg 49 : 907, 1989*
30. Reinhart RA, Marx JJ, Broste SK, Haas RG : *Myocardial magnesium : relation to laboratory and clinical variables in patients undergoing cardiac surgery. J Am Coll Cardiol 17 : 651, 1991*
31. Smith JS. Coronade R, Meissner G : *Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide activated calcuim channel. Nature 316 : 446, 1985*
32. Smith JS. Coronado R, Meissner G : *Single channel measurement of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J Gen Physiol 88 : 573, 1986*
33. Smith JS, Imagawa T, Ma J, Campbell KP, Coronado R : *Purified ryanodine receptor from*

34. Stephenson EW : *Magnesium effect on activation of skinned fibers from striated muscle. FASEB 40 : 2662, 1981*

rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. J Gen Physiol 92 : 10, 1988