

쥐 심실에서 Digitalis Receptor Desensitization에 관한 연구

이신웅* · 이정수 · 장태수

영남대학교 약학대학

Studies on Digitalis Receptor Desensitization in Rat Ventricle

Shin-Woong LEE*, Jeung-Soo LEE and Tae-Soo JANG

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received June 7, 1994; accepted July 2, 1994)

Abstract— $[^3\text{H}]$ Ouabain binding parameters (K_D and B_{max}) to control rat ventricular strips and Langendorff preparations which were not previously exposed to ouabain were compared with those to both preparations that had been first exposed to a complete ouabain dose range of dose-response curve (10^{-8} M to 10^{-4} M). In rat ventricular strips and Langendorff perfused heart preparations, cumulative dose-response curves of ouabain revealed biphasic positive inotropic effects, a "low-dose" effect and a "high-dose" effect with ED_{50} values of $0.5 \mu\text{M}$ and $35 \mu\text{M}$ ouabain, respectively. The "low-dose" effect in ventricular strip disappeared or was diminished significantly when the ouabain dose-response curve was repeated after the washout of the effects of the first dose-response curve, whereas there were no significant differences in the maximal "high-dose" effect in both exposures to ouabain. However, both of the control and ouabain-preexposed Langendorff perfused hearts revealed the same low-dose effects. The K_D value for $[^3\text{H}]$ ouabain binding and the ouabain binding site concentration (B_{max}) estimated by $[^3\text{H}]$ ouabain displacement assay in control preparations were 230 nM and 2 pmol/mg protein, respectively. $[^3\text{H}]$ Ouabain binding parameters were not changed by repeated exposure to high concentrations of ouabain. These results suggest that digitalis receptor desensitization in the rat ventricular strip may due to the change of post-receptor events induced by ouabain binding to a high affinity site (α_2 isoform).

Keywords □ digitalis receptor, desensitization, rat ventricle, inotropic effect, $[^3\text{H}]$ ouabain binding.

Na^+, K^+ -ATPase는 강심배당체의 약리학적 receptor로 강심배당체가 이 효소에 결합하면 효소활성이 억제되어 심장수축력이 증가된다(Akera, 1977; Dahl과 Hokin, 1974; Schwartz 등, 1968). 그러나 근래에 와서 Na^+, K^+ -ATPase에는 ouabain에 대한 affinity가 다른 두 종류 이상의 isoform이 존재한다고 보고(Lytton 등, 1985; Ng와 Akera, 1987; Shull 등, 1986; Sweadner, 1979; 1985; Sweadner와 Gilkeson, 1985; Young과 Lingrel, 1987)됨으로써 이들 ouabain결합부위와 isoform간의 상관성 내지는 기능적 의의와의 상관성에 관하여 다양한 측면에서 추구하고 있다.

쥐심실은 강심배당체에 대한 감수성이 매우 적은 장기(Akera 등, 1969)로서 강심배당체에 의하여 두가지 양

상의 수축력 증가반응(biphasic positive inotropic responses)을 일으키며 low-dose response의 ED_{50} 치가 $[^3\text{H}]$ ouabain결합실험으로 추정된 ouabain의 K_D 치와 일치하고, high-dose response의 ED_{50} 치가 Na^+, K^+ -ATPase활성억제로부터 구한 I_{50} 치와 일치한다는 점(Adams 등, 1982; Lee 등, 1983) 및 low-dose response를 일으키는 농도에서도 세포내 Na^+ 농도를 증가시킨다는 점(Grupp 등, 1985)에서 biphasic한 반응은 다같이 ouabain이 Na^+, K^+ -ATPase에 결합한 결과로 생각되고 있다. 또한 쥐심실에는 ouabain에 affinity가 큰 Na^+, K^+ -ATPase의 α_2 isoform과 affinity가 적은 α_1 isoform이 혼재해 있는 것으로 확인(Akera 등, 1986; Charlemagne 등, 1987; Young과 Lingrel, 1987)됨으로써 ouabain의 low-dose response는 α_2 isoform의 억제로, high-dose response는 α_1 isoform의 억제로 유도된다는 결론에 이르게 되었다.

* To whom correspondence should be addressed.

Grupp 등(1981)은 쥐 우심실 표본에서 ouabain의 cumulative dose에 의한 biphasic response중 low-dose response가 표본을 영양액으로 씻은 후의 cumulative dose-response curve에서는 나타나지 않음을 관찰하고 이를 digitalis receptor desensitization 또는 receptor memory로 표현하여 기능적인 면에서 Na^+ , K^+ -ATPase의 α_2 isoform과 α_1 isoform 간에 상당한 차이가 있을 가능성을 시사하였다. 그러나 이들의 실험결과에서 처음 가한 ouabain이 세척과정을 통하여 충분히 제거되지 않고 일부 소량의 ouabain이 receptor를 점령하고 있다면 두번째 용량 반응곡선에서 low-dose response가 나타나지 않을 수도 있다. 이 경우 α_2 isoform에 대한 ouabain 결합성질에 변화가 있을 것으로 예상되나 현재 까지도 쥐 심실표본에서 이 점에 관한 분명한 설명이 되어지지 않고 있다.

따라서 본 실험에서는 영양액만 접촉시킨 쥐심실 표본과 고농도 ouabain을 접촉시킨 후 영양액으로 세척한 우심실 표본에서 [^3H]ouabain 결합실험을 시행하여 ouabain 결합성질에 변화가 있는지를 검토하고자 하였다.

실험방법

심장 관류실험

체중 250~300 g의 건강한 쥐를 pentobarbital(30 mg/kg)로 마취하고 heparin(20 mg)을 주사한 다음 심장을 적출, 미리 95% O_2 와 5% CO_2 로 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액(pH 7.4)으로 Grupp 등(1984)의 방법에 따라 관류시켰다. 관류액의 온도는 37°C로 유지하고 관류압력은 약 60 mmHg가 되게 조절하였으며 좌심실압은 좌심실에 삽입한 catheter를 통하여 기록되게 하였다. 관류액을 약 30분 동안 관류하여 평형이 되게 한 후 ouabain 10^{-8} ~ 10^{-4} M을 10분 동안 infusion pump로 심실내로 infusion 하고 각 농도의 ouabain에 의한 심장 수축력변화를 관찰하였다.

심실편에 대한 실험

쥐 우심실편을 길이 약 8 mm, 폭이 약 2 mm되게 적출하여 95% O_2 와 5% CO_2 로 포화시킨 Tyrode 용액(137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1.05 mM MgSO_4 , 0.42 mM KH_2PO_4 , 11.9 mM NaHCO_3 및 10 mM glucose, pH 7.0) 중에 현수하고 1g의 initial load를 가한 다음 전기자극(1 Hz, 2 msec, 3~5V)하였다. 심실수축은 isometric transducer를 통하여 기록되게 하고 ouabain에 대한 반응은 전기자극에 대한 표본의 반응이 일정하게 되는 60~120분 후부터 관찰하였다. Ouabain은 cumulative dose로 가하였으며 한 농도의 ouabain을 가하고 10분 동안 반응을 관찰한 후 다음 농도의 ouabain을 가하였다.

첫번째 cumulative dose로 ouabain의 효과를 관찰한 후에는 표본을 영양액으로 120분 동안 충분히 세척하고

전기자극에 대한 심실의 반응이 ouabain을 가하기 전의 대조반응으로 회복됨을 확인한 다음 ouabain의 두번째 cumulative dose-response를 관찰하였다.

심실 homogenates의 제조

관류한 심실 또는 전기자극한 우심실표본 30~40 mg을 50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 5 mM MgCl_2 및 5 mM Tris·Pi를 함유하는 빙냉의 medium 1~2 mls에 가하고 가위로 세절한 다음 glass homogenizer 중에서 motor-driven teflon pestle로 균질화(5 passes, 1분 간격으로 3회) 하였다.

Homogenate의 단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

[^3H]Ouabain 결합실험

[^3H]Ouabain 결합실험은 여과법(Wallick 등, 1978)에 의하였다. 즉 50 mM Tris·Cl(pH 7.4), 5 mM MgCl_2 , 5 mM Tris·Pi, 100 nM [^3H]ouabain 및 여러 농도의 비표지 ouabain을 함유하는 medium 중에 일정량의 homogenate를 가하여 일정시간 반응시킨 후 여과하였다.

예비실험결과 100 nM [^3H]ouabain 존재하에서 homogenate의 [^3H]ouabain 결합이 60분에 평형에 도달하였으므로 본 실험에서는 반응액을 37°C에서 평형에 도달하는 충분한 시간인 90분 동안 반응시켰으며 반응액의 최종 용적은 2 ml로 하였다. 결합반응을 시작한 후 정확히 90분에 반응액 0.9 ml를 2회 채취하고 즉시 methylcellulose filter(0.45 μm)상에서 여과, 세척한 다음 liquid scintillation counter로 그 방사능을 측정하였다.

[^3H]Ouabain 특이결합에 의한 특이방사능은 전체방사능에서 5.5 mM 비표지 ouabain 존재하에서 측정된 비특이방사능을 뺀 값으로 하였다.

[^3H]Ouabain 결합의 kinetic parameters 산출

본 실험에서는 100 nM [^3H]ouabain과 여러농도의 비표지 ouabain을 가하고 [^3H]ouabain 결합실험을 시행하여 비표지 ouabain을 공존시켰을 때의 [^3H]ouabain 결합을 비표지 ouabain이 없을 때의 [^3H]ouabain 결합의 백분율로 환산한 다음 [^3H]ouabain 결합의 50%를 억제하는 비표지 ouabain의 농도($C_{0.5}$)를 구하고 이 농도를 기준으로 다음식에 의거, ouabain의 affinity(K_D)와 결합 부위농도(B_{max})를 산출하였다(Akera와 Cheng, 1977).

$$K_D = C_{0.5} - a$$

$$B_{max} = B_e \cdot C_{0.5} / a$$

a: 사용한 [^3H]ouabain의 농도(100 nM).

B_e : 비표지 ouabain을 가하지 않았을 때의 [^3H]ouabain 평형결합.

실험성적 분석

모든 결과는 평균치±평균오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Student's *t* test에 의하였고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

실험결과

쥐 우심실 표본에서 ouabain의 용량-반응곡선

전기자극에 대한 심실표본의 반응이 일정하게 되었을 때 bath내로 ouabain을 cumulative dose로 가하면서 각 농도에서의 ouabain의 효과를 기록 관찰하였다. Fig. 1에 도시된 ouabain의 전형적인 용량-반응곡선은 10^{-7} M에서 약 10^{-5} M까지의 low-dose effect와 10^{-5} M에서 1.6×10^{-4} M까지의 high-dose effect로 구분될 수 있는 두가지 양상의 curve(biphasic curve)를 나타내고 있다. 이와 같은 ouabain의 용량-반응곡선으로부터 추정된 low-dose effect의 ED_{50} 치는 총 20예에서 510 ± 150 nM, high-dose effect의 ED_{50} 치는 34.2 ± 5.7 μ M이었으며, low-dose effect와 high-dose effect는 ouabain에 의한 최대수축력 증가효과의 각각 $31 \pm 5.8\%$ 및 $69 \pm 6.2\%$ 에 해당되었다.

한편, ouabain의 첫번째 용량-반응을 관찰한 후 영양액으로 우심실표본과 bath내를 매 10분마다 2시간 동안 충분히 세척하고 두번째 ouabain의 용량-반응을 관찰했을 때는 ouabain의 high-dose effect($ED_{50} : 30.5 \pm 6.3$ μ M, $n=20$)만 나타나고 low-dose effect는 소실되었다.

관류심장에서 ouabain의 용량-반응곡선

전술한 우심실 표본의 두번째 ouabain용량-반응곡선에서 low-dose effect의 소실이 먼저 가한 ouabain의 불완전 세척에 기인한 것인지에 관한 지견을 얻고자 관상동맥계를 통하여 ouabain이 심근세포로부터 더욱 효과적으로 제거될 수 있는 Langendorff관류심장에서 ouabain효과를 관찰하였다.

본실험에서는 쥐 심장을 적출하고 Langendorff장치에

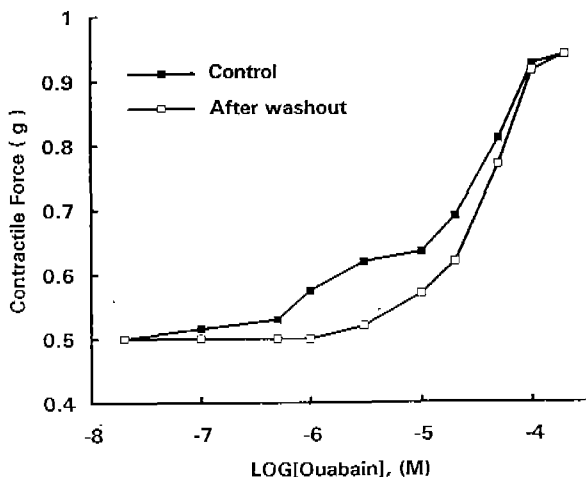


Fig. 1. A typical cumulative dose-response curve of ouabain in rat ventricular strip.

Filled squares: Initial dose-response curve "first expose" showing two positive inotropic effects. Open squares: Second dose-response curve obtained 120 min after washout of the first ouabain exposure showing absence of "low-dose" effect and single "high-dose" effect.

연결한 다음 Krebs-Henseleit용액으로 계속 관류하면서 심실의 운동이 일정하게 되었을 때 관류액 중에 ouabain ($10^{-8} \sim 10^{-4}$ M)을 가하여 각 농도의 ouabain에 의한 심실수축력 증가를 ouabain이 없을 때의 심실수축력의 백분율(%)로 표시하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 관류심장에서도 ouabain은 low-dose response($ED_{50} : 0.32 \pm 0.11$ nM, $n=6$)와 high-dose response($ED_{50} : 36 \pm 8.4$ μ M, $n=6$)로 구분될 수 있는 두가지 양상의 용량-반응곡선을 보였으나 두번째 용량-반응곡선에서 우심실 표본에서와는 달리 ouabain의 low-dose response($ED_{50} : 0.30 \pm 0.10$ nM, $n=6$)가 그대로 나타났다.

[³H]Ouabain 평형결합

심근세포로부터 ouabain이 더욱 효과적으로 세척, 제거될 수 있는 관류심장에서는 세척 후에도 ouabain의 low-dose effect가 그대로 나타나는 반면, 세척에 의한 ouabain의 제거가 상대적으로 어려운 상태인 우심실 표본에서는 두번째 ouabain의 용량-반응곡선에서 low-dose effect가 소실되었다는 점은 첫번째 가한 ouabain이 완전히 제거되지 않았을 가능성을 시사하므로 본 실험에서는 ouabain을 접촉시키지 않은 표본과 접촉시킨 표본의 [³H]ouabain결합을 비교하여 보았다.

Table I은 100 nM의 [³H]ouabain과 각 표본으로부터 제조한 homogenate를 medium 중에서 90분간 반응시켰을 때 homogenate의 [³H]ouabain평형결합 정도를 요약한 것으로 우심실 표본의 경우 ouabain에 접촉되지 않은 대조군과 ouabain에 접촉된 실험군에서 다같이 단백질 mg당 약 0.6pmol의 ouabain이 결합되고, 관류심장

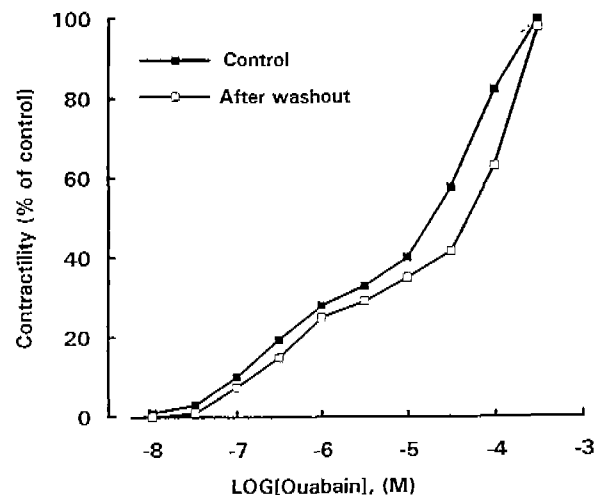


Fig. 2. Dose-response curve of ouabain in Langendorff perfused rat heart.

Filled squares: First dose-response curve. Open squares: Second dose-response curve obtained 60 min after washout of the first ouabain exposure ($10^{-8} \sim 10^{-4}$ M). Each point denotes mean of 6 hearts.

Table I. [³H]Ouabain equilibrium binding to the right ventricular strips and the Langendorff perfused hearts of rats

	[³ H]Ouabain equilibrium binding (pmol/mg)	
	Control	Pre-exposed to ouabain
Ventricular strip	0.60 ± 0.027	0.64 ± 0.025
Perfused ventricle	0.62 ± 0.019	0.64 ± 0.039

Ventricular homogenates were prepared by homogenization of 30 to 40 mg of electrically stimulated right ventricular strip or perfused ventricle with glass homogenizer in 2 ml of the cold medium containing 50 mM Tris·Cl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris·Pi. Homogenate protein (200 μg/ml) was added to a solution containing 50 mM Tris·Cl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris·Pi and 100 nM [³H]ouabain. The reaction mixture was incubated for 90 min at 37°C and rapidly filtered on 0.45 μm methylcellulose filters (Gelman) by a filtration method (Wallick 등, 1978). Nonspecific binding was measured in the presence of 5.5 mM unlabeled ouabain. Each value represents the mean ± S.E.M. of six ventricular strips and perfused ventricles.

표본에서도 이와 유사한 ouabain 결합이 일어남을 보여 주고 있다. 즉 우심실 표본에서 ouabain의 첫번째 용량-반응곡선을 관찰하고 120분 동안 세척한 후에도 [³H]ouabain 평형결합은 ouabain에 접촉되지 않은 대조군과 유사하였다.

[³H]Ouabain 결합의 displacement assay

약물의 특정 receptor에 대한 결합 정도는 receptor에 대한 약물의 affinity와 결합부위 농도에 의하여 결정된다. 따라서 ouabain 처리 전후의 심실표본과 관류심장에서 [³H]ouabain 평형결합의 차이가 없었다는 점만으로는 두군의 ouabain 결합성질이 같다고 단정할 수 없으므로 이에 대한 지견을 얻고자 [³H]ouabain 결합의 displacement assay (Akera와 Cheng, 1977)를 시행하였다.

본 실험에서는 100 nM [³H]ouabain과 여러 농도의 비표지 ouabain을 함유하는 medium 중에 homogenate 단백질(200 μg/ml)을 가한 후 90분간 반응시켰으며, 각 농도의 비표지 ouabain 존재하에서 측정된 [³H]ouabain 결합을 비표지 ouabain을 가하지 않은 대조군의 [³H]ouabain 평형결합의 백분율로 나타내었다. Fig. 3-A, B에서 보는 바와 같이 우심실·표본과 관류심장으로부터 제조한 homogenate의 [³H]ouabain 결합은 다같이 비표지 ouabain 60 nM, 200 nM, 600 nM, 2000 nM 및 6000 nM에서 각각 약 20%, 45%, 60%, 80% 및 90% 억제 되었으며, 이러한 비표지 ouabain에 의한 [³H]ouabain 결합억제 정도는 ouabain의 dose-response를 관찰한 다음 ouabain을 세척한 표본에서도 유사하였다.

Table II는 Fig. 3에서 [³H]ouabain 결합의 50%를 억제하는 비표지 ouabain의 농도(C_{0.5})를 구하고 이로부터 ouabain의 K_D치와 결합부위 농도(B_{max})를 계산하여 요약 정리한 것으로 우심실 표본과 관류심장에서 대조군의 ouabain의 K_D치는 각각 245 nM 및 222 nM, B_{max}는 2.1

Table II. K_D value and ouabain binding site concentration (B_{max}) in homogenate from non-exposed (control) and pre-exposed ventricle to ouabain

		K _D	B _{max}
		(nM)	(pmol/mg)
Ventricular Strip	Control	245.1 ± 52.4	2.05 ± 0.27
	Pre-exposed	235.4 ± 39.4	2.05 ± 0.18
Perfused Ventricle	Control	221.7 ± 23.0	2.01 ± 0.09
	Pre-exposed	233.3 ± 34.2	2.13 ± 0.23

Homogenate from right ventricular strip and perfused right ventricle were prepared as described in Table I. The apparent K_D and B_{max} were calculated by the following equations: K_D = C_{0.5} - a, B_{max} = Be · C_{0.5} / a, where C_{0.5} is the concentration of unlabeled ouabain that caused a 50% reduction of the previously bound labeled ouabain, a is the labeled ouabain concentration, and Be is the equilibrium binding of the labeled ouabain in the absence of unlabeled ouabain. Each value represents the mean ± S.E.M. of six preparations.

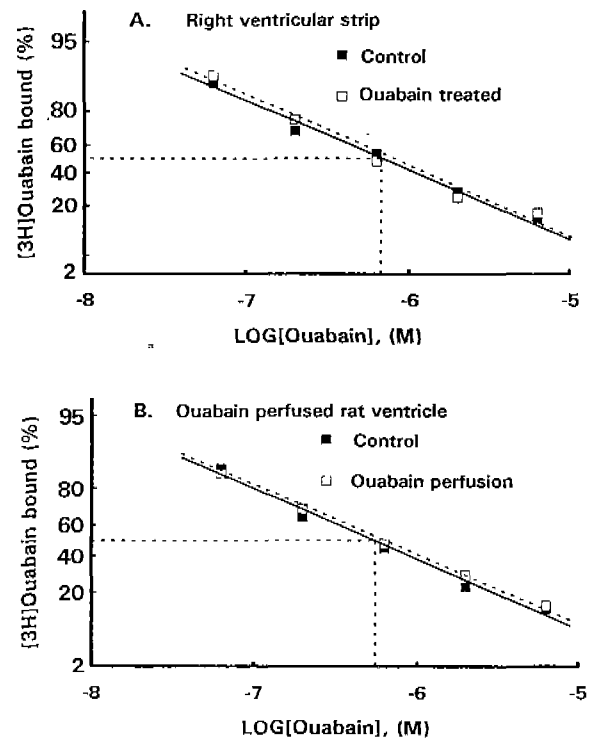


Fig. 3. Probit plot of data obtained from [³H]ouabain displacement assay.

Each point (mean of four or five determinations) represents the percent decrease of specific [³H]ouabain bound at equilibrium displaced by increasing concentrations of unlabeled ouabain (as indicated on the abscissa). ■—■: control, □—□: pre-exposed to ouabain. See Methods for details of binding assay.

및 2.0 pmol/mg으로 두군에서 유사하였으며 ouabain에 접촉된 후에도 이들 parameter들의 유의한 변화는 없었다.

고 찰

본 실험결과 쥐 우심실 표본의 [^3H]ouabain 결합성질은 고농도 ouabain에 노출된 후에도 변화되지 않음을 알 수 있었다. 일반적으로 ouabain에 감수성이 큰 토끼, 고양이 및 guinea pig 심장은 ouabain에 대하여 단일 수축력 증가반응(monophasic response)을 일으키는데 비하여 ouabain에 감수성이 적은 rat 심실은 두가지 양상의 수축력 증가반응(biphasic inotropic response)을 나타내는 것으로 알려지고 있으며(Erdmann 등, 1980; Finet 등, 1982; Grupp 등, 1981; Herzig와 Mohr, 1984; Koomen 등, 1982), 본 실험의 rat 심실에서도 이 점을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 ouabain 결합 실험으로 추정된 ouabain의 K_D 치(~ 230 nM)가 biphasic inotropic response 중 low-dose response의 ED_{50} 치(300~500 nM)와 유사한 점으로 미루어 ouabain의 low-dose response는 ouabain이 high-affinity site(α_2 isoform)에 결합한 결과로 생각되고, ED_{50} 치가 약 $35 \mu\text{M}$ 인 ouabain의 high-dose response는 ouabain이 low-affinity site(α_1 isoform)에 결합한 결과로 생각된다.

그러나 ouabain의 low-affinity site에 대한 K_D 치를 displacement assay로 측정하기 위해서는 고농도의 [^3H]ouabain과 이에 따른 고농도의 비표지 ouabain을 사용해야 하는 어려움이 따른다. 따라서 rat 심실에서 ouabain의 low-affinity site에 대한 K_D 치는 Na^+, K^+ -ATPase 활성을 50% 억제하는 ouabain의 I_{50} 치로 간접적으로 추정함이 바람직하나 본 실험결과 고농도의 ouabain에 노출된 심실에서도 ouabain의 high-dose response가 그대로 나타나는 것으로 보아 α_1 isoform의 성질은 변하지 않는 것으로 생각되었으므로 이 isoform에 대한 ouabain의 K_D 치는 추정하지 않았다.

전술한 바와 같이 ouabain의 low-dose response를 일으키는 α_2 isoform의 성질은 [^3H]ouabain 결합 실험으로 쉽게 탐지될 수 있다. 본 실험에서 우심실 표본이 고농도의 ouabain에 노출된 후에 ouabain의 low-dose response를 일으키지 않은 것이 α_2 isoform 자체의 성질 변화에 기인 한다면 ouabain의 K_D 치가 증가하거나 결합부위 농도가 감소할 것이다. 한편, 우심실 표본에서 첫번째 ouabain의 용량-반응곡선을 관찰하고 충분히 세척한 후 두번째 ouabain의 용량증가에 따른 반응증가를 관찰할 때 첫번째 가해진 ouabain의 불완전 세척으로 인하여 소량의 ouabain이 α_2 isoform에 결합되어 있을 경우 두번째 용량-반응곡선에서 low-dose response가 나타나지 않을 가능성도 있고 이 경우에 ouabain에 대한 high-affinity site(α_2 isoform)의 수(결합부위 농도)는 변하지 않고 ouabain의 K_D 치가 높게 측정될 것이다. 그러나 [^3H]ouabain 결합 실험결과 우심실 표본에서 ouabain의 K_D 치나 α_2 isoform의 수가 ouabain에 노출된 후에도 전혀 변하지 않았다. 따라서 관류 심실과는 달리 우심실 표본에서

고농도 ouabain 접촉에 의한 low-dose response의 소실(desensitization)은 불완전 세척이나 α_2 isoform 자체의 변화에 기인하는 것이라기 보다는 ouabain이 α_2 isoform에 결합하여 Na^+ -pump를 억제함으로써 유도되는 Ca^{2+} 의 동원과 같은 심실근세포의 반응과정(post-receptor events)의 변화에 기인하는 것으로 추정된다. 한편, 관류심장에서는 고농도의 ouabain에 노출된 후에도 low-dose response가 그대로 나타났음은 관류심장의 경우 관상동맥계를 통하여 ouabain이 그 작용부위에 도달하고 또 세척에 의하여 제거되는 과정이 우심실 표본보다 더욱 단순하고 효과적이라는 점에 기인할 가능성도 있다. 그러나 이러한 심근세포의 작용부위에 도달하고 또 작용부위로부터 제거되는 과정의 차이가 어떤 기전을 통하여 α_2 isoform을 통한 post-receptor events의 변화를 초래하는지에 관해서는 본 실험결과만으로는 유추하기 어렵고 앞으로 더욱 추구되어야 할 과제라 생각된다.

참고문헌

- Adams, R. J., Schwartz, A., Grupp, G., Grupp, I., Lee, S. W., Wallick, E. T., Powell, T., Twist, V. W. and Gathiram, P. (1982). High-affinity ouabain binding site and low-dose positive inotropic effect in rat myocardium. *Nature* (Lond.) **296**, 167-169.
- Akera, T. (1977). Membrane adenosine triphosphatase: A digitalis receptor? *Science* **198**, 569-574.
- Akera, T. and Cheng, V. K. (1977). A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies. *Biochem. Biophys. Acta.* **470**, 412-423.
- Akera, T., Harsen, F. S. and Brody, T. M. (1969). The effect of ouabain on sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **170**, 17-26.
- Akera, T., NG, Y. C., Hadley, R., Katano, Y. and Brody, T. M. (1986). High affinity and low affinity ouabain binding site in the rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* **132**, 137-146.
- Charlemagne, D., Mayoux, E., Poyard, M., Oliviero, P. and Geering, K. (1987). Identification of two isoforms of the catalytic subunit of Na^+, K^+ -ATPase in myocytes from adult rat heart. *J. Biol. Chem.* **262**, 8941-8943.
- Dahl, J. H. and Hokin, L. E. (1974). The sodium-potassium adenosine triphosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 256-273.
- Erdmann, E., Philipp, G. and Scholz, A. (1980). Cardiac glycoside receptor, (Na^+, K^+)-ATPase activity and force of contraction in rat heart. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 3219-3229.
- Finet, M., Noel, F. and Godfraind, T. (1982). Inotropic effect and binding sites of ouabain to rat heart. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **256**, 168-170.
- Grupp, I., Im, W. B., Lee, C. O., Lee, S. W., Pecker, M. S. and Schwartz, A. (1985). Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *J. Physiol.* **360**, 149-160.
- Grupp, I. L. and Grupp, G. (1984). Isolated heart preparations

- perfused or superfused with balanced salt solutions. In: Method in Pharmacology (A. Schwartz, Ed.), *Plenum Publ.* Vol. 5. pp. 111-128,
- Grupp, I. L., Grupp, G. and Schwartz, A. (1981). Digitalis receptor desensitization in rat ventricle: Ouabain produces two inotropic effects. *Life Science* **29**, 2789-2794.
- Herzig, S. and Mohr, K. (1984). Action of ouabain on rat heart: Comparison with its effect on guinea-pig heart. *Br. J. Pharmacol.* **82**, 135-142.
- Koomen, J. M., Van Gilst, W. H., Zimmerman, A. N. E. and Van Noordwijk, J. (1982). A concentration-dependent biphasic positive inotropic action of ouabain on isolated hearts of rat and guinea pig. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **255**, 212-219.
- Lee, S. W., Schwartz, A., Adams, R. J., Yamori, Y., Whitmer, K., Lane, L. K. and Wallick, E. T. (1983). Decrease in Na^+ , K^+ -ATPase activity and [^3H]ouabain binding site in sarcolemma prepared from hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **5**, 682-688.
- Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lytton, J., Lin, J. C. and Guidotti, G. (1985). Identification of two molecular forms of (Na^+ , K^+)-ATPase in rat adipocytes-Relation to insulin stimulation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **260**, 1177-1184.
- NG, Y. C. and Akera, T. (1987). Two classes of ouabain binding sites in ferret heart and two forms of Na^+ , K^+ -ATPase. *Am. J. Physiol.* **252** (Heart circ. Physiol. 21), H1016-H1022.
- Schwartz, A., Matsui, H. and Laughter, A. H. (1968). Tritiated digoxin binding to Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase: Possible allosteric site. *Science* **159**, 323-325.
- Shull, G. E., Greeb, J. and Lingrel, J. B. (1986). Molecular cloning of three distinct forms of the Na^+ , K^+ -ATPase α -subunit from rat brain. *Biochemistry* **25**, 8125-8132.
- Sweadner, K. J. (1979). Two molecular forms of (Na^+ , K^+)-stimulated ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* **254**, 6060-6067.
- Sweadner, K. J. (1985). Enzymatic properties of separated isozymes of the Na^+ , K^+ -ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity and ion transport stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **260**, 11508-11513.
- Sweadner, K. J. and Gilkeson, R. C. (1985). Two isozymes of the Na^+ , K^+ -ATPase have distinct antigenic determinants. *J. Biol. Chem.* **260**, 9016-9022.
- Wallick, E. T., Anner, B. M., Ray, M. V. and Schwartz, A. (1978). Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide-treated (Na^+ , K^+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8778-8786.
- Young, R. M. and Lingrel, J. B. (1987). Tissue distribution of mRNAs encoding the α isoforms and β subunit of rat Na^+ , K^+ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **145**, 52-58.