

단일심근 세포의 활동전압 및 막전류에 대한 Na-Ca 교환기전의 영향

서울대학교 의과대학 생리학교실

호 원 경·서 인 석*·엄 용 의

(1989년 10월 13일 접수)

= Abstract =

Effect of Na-Ca Exchange on the Action Potential and the Membrane Current of Rabbit Atrial Cells

Won Kyung Ho, In Suk So* and Yung E Earm

*Department of Physiology, College of Medicine, Seoul National University and *Inha University*

The electrophysiological properties of the inward current contributing to the late plateau phase of the action potential were investigated using the whole cell clamp technique and intracellular dialysis in single atrial cells isolated from the rabbit heart.

The inward current was activated by various repolarizing pulses after a brief depolarizing pulse to +40 mV for 2 ms and its time course was similar to that of the late plateau of the action potential. The current was fully activated above the potential of -40 mV and abolished by intracellular EGTA. Ryanodine of 1 μ M also abolished the late plateau and the inward current. Reduced Na_o to 30% and 20 mM Na_i diminished the late plateau together with the inward current. Diltiazem blocked the activation of the current and Ni in the concentration of 40~200 μ M decreased the development of the late plateau and the inward current.

Fully activated current-voltage relation of the inward current showed exponential voltage dependency which was steeper in more hyperpolarizing range. The above findings suggest that the inward current was activated by intracellular calcium and contribute the late plateau phase of the action potential. It could be concluded that the inward current would be the inward component of Na-Ca exchange.

Key Words: Atrial cell, Late plateau phase, Na-Ca exchange, Whole cell clamp, Inward current

서 론

심장근 세포에서 활동전압의 plateau 기간에 여러 가지 종류의 이온전류가 관여함이 알려져 있다 (DiFrancesco & Noble, 1985). 전에는 활동전압의

plateau는 Ca-전류에 의해서 유지되는 것으로 여겨 왔었다(Beeler & Reuter, 1970). 그러나 근래에 단일심근 세포에서 기록한 Ca-전류의 특성을 보면 최대 활성화가 종래에 기록된 것같이 20~100 ms내에 도달하는 것이 아니고 2~5 ms내에 일어나는 빠른 활성화를 보이고 비활성화 시정수 (inactivation time constant)도 10~20 ms에 불과함이 밝혀졌다(Isenberg & Klöckner, 1982; Lee & Tsien, 1982; Hume & Giles, 1983; Mitchell et al, 1983; Matsuda & Noma,

*인하대학교 의과대학 생리학교실

†본 연구는 1988년도 서울대학교 병원 특진연구비로 이루어 졌음.

1984). 활성화 및 비활성화가 이와 같이 매우 빠르기 때문에 활동전압 plateau 전기간이 Ca-전류에 의하여 일어난다고 보기는 어렵다(Noble, 1984). 그렇다면 plateau 기간엔 다른 전류들이 관여해야만 한다. 가능성있는 전류계로서 plateau 기간동안 계속 활성화되는, cadmium에 억제되지 않는 Ca-전류가 보고된 바 있다(Lee et al, 1984). Ca-전류 이외에도 K-전류계, 예를 들어 일과성 외향전류(transient outward current, Mitchell et al, 1984a; Hilgemann, 1986; Clark et al, 1988), background inward rectifier 전류(Hume & Uehara, 1985), 그리고 delayed rectifier 전류(Kass & Wieggers, 1982; Mitchell et al, 1984c) 등이 활동전압의 plateau와 기간을 변화시킬 수 있다. 또 plateau 기간동안 비활성화 되지 않는 Na-전류의 window current도 plateau 유지에 관여할 것으로 고려되고 있다(Attwell et al, 1979). 특히 쥐 심실근세포나 토끼 심방근에서는 Ca-전류는 활동전압의 초기부분에서만 관여하는 것으로 알려지고 있다. 막전압이 비교적 과분극인 범위에서 나타나는 late plateau 성분에서는 세포내 Ca^{2+} 에 의하여 활성화되는 다른 종류의 내향전류가 관여함이 알려지게 되었고 이 내향전류는 결국 세포내 저장고로부터 Ca-전류와 간접적으로 연관되어 있다(Mitchell et al, 1984b; Schouten & Hilgemann, 1986; Hilgemann & Noble, 1986). 활동전압의 late plateau와 내향전류는 세포밖 Na^+ 을 Li^+ 으로 대체하거나, ryanodine 처리시 혹은 세포내 EGTA를 주입시에는 소실되었다(Mitchell et al, 1984; Mitchell et al, 1987). 이러한 결과로부터 내향전류는 세포내 Ca^{2+} 에 의하여 활성화되고 Na^+ 에 의하여 일어나는 전류로 생각하게 되었다. Ca^{2+} 에 의하여 활성화되는 내향전류가 존재한다는 사실은 caffeine 처리로 세포내 저장고인 근장그물(sarcoplasmic reticulum, 이하 SR로 줄임)로부터 Ca^{2+} 유리를 일으킨 다음에 밝혀지게 되었으며 이 전류가 Na-Ca 교환에 의한 내향전류임을 관찰하였다(Mechmann & Pott, 1986). 그리고 guinea-pig 심실근세포에서 patch clamp 방법과 세포내 관류법(internal dialysis)을 이용하여 Na-Ca 교환전류의 특성이 밝혀지게 되었다(Kimura et al, 1987). 그러나 내향전류가 정상 활동전압 기간동안

에 활성화 되는지, 만약 활성화 되면 얼마만한 크기의 전류를 발생할 것인가, 또 이들의 막전압 의존성 및 시간경과가 어떠한지는 분명하지 않았다. 이에 저자는 토끼의 단일심방근에서 내향전류의 존재를 확인하고 아울러 정상 활동전압 기간중 세포내 Ca^{2+} 에 의하여 활성화 됨을 밝히고자 하였다. 아울러 내향전류의 막전압 의존성, Na^+ 과 Ca^{2+} 에 의한 변화 그리고 Ca-통로 차단제의 효과를 분석하고자 하였다.

실 험 방 법

토끼 단일 심방근은 Kimura et al (1987)의 보고와 비슷한 방법을 사용하여 분리하였다. 간단하게 분리과정을 요약하면 다음과 같다. 대동맥에 catheter를 넣어 Langendorff perfusion을 한 상태에서 collagenase (20 mg/50 ml, Sigma type I)가 함유된 low Ca^{2+} -Tyrode 용액(Ca^{2+} 농도 : 30~50 μM)으로 10~15분 관류시킨 다음 심방부분을 떼어내서 잘 흔들어서주고 떨어져 나온 세포들을 low Cl, high K 저장용액에 넣어 4°C에 보관하였다.

실험용액의 조성을 보면 정상 Tyrode 용액은 (mM) ; NaCl, 140; KCl, 5.4; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; $NaHPO_4$, 0.33; glucose, 5; HEPES, 5 (pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추었다)이고 Na^+ 을 줄이는 실험에서는 NaCl대신 동량의 LiCl로 대체하였다. 전극내 용액은 (mM); K-aspartate, 110; Mg-ATP, 5; di-Tris-creatine phosphate, 5; $MgCl_2$, 1; KCl, 20; HEPES, 5 (pH는 KOH로 적정하여 7.4로 맞추었다); EGTA, 0.1이었다. K-전류를 차단하는 목적으로 사용된 Cs^+ -용액은 K-aspartate대신 동량의 Cs -aspartate, KCl 대신 TEA-Cl로 대체하고 pH는 $CsOH$ 로 7.4를 맞추어 만들었다. 세포내 용액의 pCa를 7.2로 만들기 위해서는 0.05 mM의 Ca^{2+} 을 가하여 만들었다. 심방근세포는 실험용기에 옮겨 35~37°C에서 1 ml/min의 속도로 관류하면서 실험하였다.

단일심방근은 patch clamp 증폭기(List, EPC-7)을 써서 Hamill et al (1981)의 방법을 이용하여 막전압 고정 혹은 막전류고정을 하였고 세포내 관류법은 Soejima & Noma (1984) 및 Earm & Irisawa (1986)

의 방법으로 하였다.

유리전극은 tip 저항이 2~3 MΩ인 것을 사용하였고 실험결과는 PCM date recorder (NF, 880)에 기록 저장하여 나중에 분석하였고 동시에 digital oscilloscope (Hitachi, 6041 혹은 Nicolet 9024)와 pen 기록기 (Harvard oscillograph)에 기록하였으며 X-Y 기록기 (Graphtec, WX 2400)에 재생, 분석하였다.

실 험 성 적

토끼 단일 심방근세포에서 기록되는 전기적 특성

을 보면 안정막 전압은 -65~-75 mV의 범위를 보이고 활동전압의 크기는 약 110 mV 그리고 활동전압의 기간은 100~250 ms의 범위를 보였다. 0.025 Hz의 낮은 빈도로 자극하였을 때 나타나는 활동전압은 재분극이 크게 두가지 phase로 구분되었다. 처음 빠르게 나타나는 재분극기와 느리게 나타나며 비교적 과분극인 막전압 부위에서 나타나는 late plateau phase로 분명하게 나뉘어졌다.

Fig. 1은 활동전압과 2 ms의 짧은 저분극 pulse를 +40 mV까지 준 다음 여러가지 재분극 pulse를 주었을 때 나타나는 전류의 기록이다. 활동전압과 -40 mV에서 기록되는 내향전류를 빠른 속도로

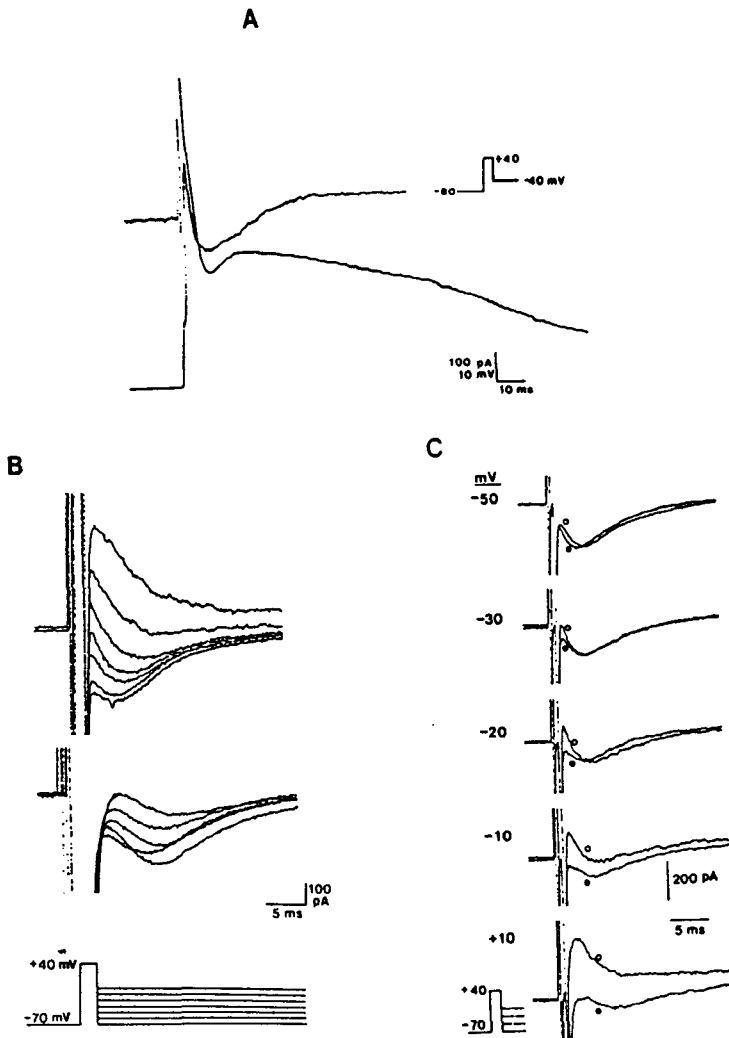


Fig. 1. The inward current and action potential in atrial cells of the rabbit. In A the activation of the inward current (upper trace) by a clamp pulse from -80 to +40 mV for 2 ms then to -40 mV (inset) was superimposed with the action potential (lower trace). Time course of the inward current and the development of the late plateau was almost identical. In B the currents in control (K inside, top trace) and in Cs solution (middle trace) was activated by a various repolarizing pulses (bottom trace). Top and middle traces were obtained in different cells. In C superimposed current records in control (○) and in 4-aminopyridine (4-AP, ●) at various potentials (inset). It can be seen that the transient outward current in the beginning of the inward current activation was abolished by Cs and 4-AP which made only the inward current component was left. Stimulation frequency was 1/40 seconds.

그런 것이다(자극빈도는 0.025 Hz). 활동전압의 late plateau phase는 보통 $-30 \sim -40$ mV에서 나타나는데 이때 기록되는 막전류의 모습과 잘 일치함을 보인다(Fig. 1A). 활동전압의 late plateau phase의 시작은 내향전류의 peak 보다 약간 늦게 나타났다. 여러가지 재분극 pulse를 가하니 저분극 방향으로 갈수록 전류의 크기가 감소하였다. 그러나 일과성 외향전류가 섞이기 때문에 저분극 크기가 커지면 내향전류의 최고값을 측정할 수 없었다(Fig. 1B 윗그림). Prepulse 기간동안에 Na 전류와 일과성 외향전류가 활성화 되었으나 그 크기가 매우 커서 그림에서는 기록 범위를 벗어났기 때문에 전체는 보이지 않았다.

일과성 외향전류가 저분극 pulse에 의하여 활성화 되어 내향전류분석에 장애가 되었기 때문에 세포내액을 Cs⁺로 채워 다른 K-전류와 함께 일과성 외향전류를 차단한 다음 내향전류만을 기록하고자 하였다. 그림 1B 가운데 그림에 Cs⁺ 용액에서 활성화되는 전류를 보인다. 저분극 pulse에 의하여 초기의 외향전류 성분이 소실되어 순수한 내향전류 성분만

이 기록됨을 알 수 있다. 1 mM의 4-aminopyridine (4-AP)으로 일과성 외향전류를 억제한 다음 내향전류를 기록하여도 동일한 경향을 보인다. 그림 1C에 보듯이 저분극 pulse에서 초기에 나타나는 외향전류의 비활성화되는 성분이 소실되고 거의 순수한 내향전류만이 기록된다(●).

-70 mV에서 기록되는 내향전류를 분석해 보면 prepulse 시작부터 5~10 ms후에 최고값에 도달하고 비활성화 시정수는 10~20 ms로서 매우 빠르게 나타났다. 이 내향전류가 세포내 Ca²⁺에 의하여 활성화 되고, 바로 SR로부터의 Ca-유리를 반영한 것이라면 최고값에 도달하는 시간이나 비활성화의 시간적 경과가 쥐 심실근세포에서 fura-2를 이용하여 측정 한 Ca-신호기록(Cannell et al, 1987)에 비하여 매우 빠르다. 그러나 guinea-pig 심실근에서 기록된 내향전류의 tail이 나타나는 시간경과(Egan et al, 1986)와 이 내향전류의 최고값에 도달하는 시간경과를 비교해보면 비교적 비슷하다.

다음에는 prepulse의 기간에 따라 내향전류의 활성화가 어떻게 달라지는가를 살펴보았다. Fig. 2A

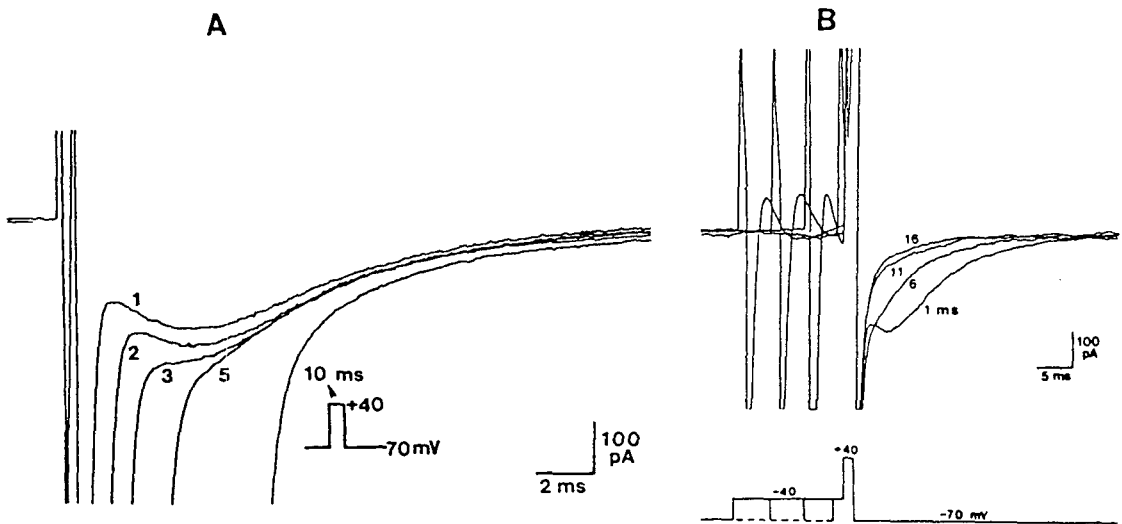


Fig. 2. Effects of the duration and level of the conditioning pulse on the activation of the inward current. When the duration of pulse increased from 1 ms to 3 ms the activation and decay of the current could be clearly seen (A). But from 5 ms it was hardly seen the activation of the current and the current decay was mixed with the capacitive current. When a various duration of pulses of -40 mV were preceded the pulse to $+40$ mV for 2 ms, the current activation was maximum in 1 m duration of prepulse and devesed gradually with increasing the duration of prepulse (B).

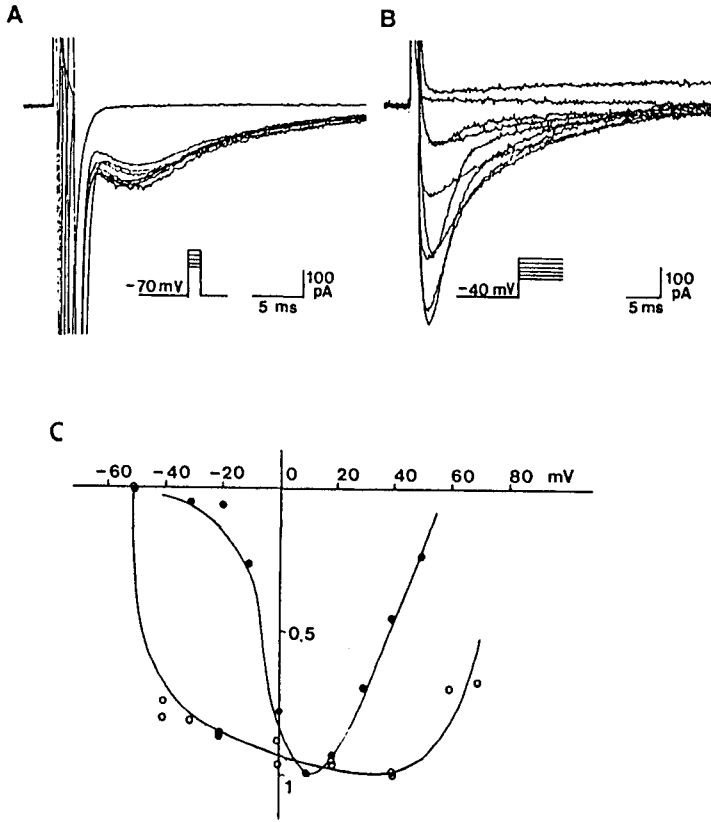


Fig. 3. Comparison of the voltage dependence of the inward current and the calcium current. In A a step depolarizing pulses were applied for 2 ms (inset) and the current activation were shown. At -50 mV there was no inward current but from -40 to $+40$ mV full magnitude of inward currents were activated. Above $+40$ mV the inward current was diminished. In B the activation of calcium current was shown by a step depolarizing pulses to $+50$ mV from -40 mV (inset). The current-voltage relationship for the inward currents (\circ) and the calcium currents (\bullet) was illustrated in C (ordinate represents the normalized value of current magnitude). The IV-curve of calcium current shows typical bell-shaped appearance with maximum activation at $+10$ mV, while that of the inward current shows all-or-none type activation pattern with peak activation at $+40$ mV.

에 prepulse의 기간을 1~10 ms 범위에서 변화시켰을 때 내향전류의 활성화를 보였다. 1~3 ms의 기간 동안에는 내향전류가 시간이 증가함에 따라 크게 기록되었고 비슷한 비활성화 시간 경과를 보였다. prepulse의 길이를 길게 하면 활성화된 최고값은 볼 수 없고 내향전류의 tail로서만 기록되기 때문에 capacitive current와 구분이 용이하지 않았다. Fig. 2B에 내향전류가 유지전압(holding potential, HP)에 따라 어떻게 영향을 받는가를 관찰하였다. -70 mV로부터 -40 mV까지 기간이 서로 다른 pulse를 준 다음 $+40$ mV까지 2 ms동안 test pulse를 주고 내향전류를 기록하였다. 가장 짧은 기간 즉 1 ms의 prepulse때 내향전류가 잘 기록되어 있으나 6 ms에서는 내향전류가 tail current로서만 기록되었고 11 ms에서는 아주 작은 내향성 tail로서 기록되었다. 이상의 결과는 SR로부터의 Ca-유리과정이 막전압에 의존함을 시사해준다(Hilgemann & Noble, 1986).

내향전류와 Ca-전류의 차이점을 알기 위하여 막전압에 따른 두 전류의 활성화를 비교하여 보았다. Fig. 3A에는 내향전류의 활성화, 그리고 Fig. 3B에는 Ca-전류의 활성화를 보인다. Ca 전류의 경우 -40 mV에서 저분극 pulse를 가하여 보면 -30 mV에서 활성화되어 $+10$ mV에서 최대값을 보인다(Fig. 3C의 \bullet 표시). 막전압이 더 저분극되면 Ca-전류는 점차 감소한다. 그러나 내향전류는 -70 mV로부터 2 ms동안의 pulse를 주어 활성화 시켰는데 그림 3A, C에 보이듯이(Fig. 3C의 \circ 표시) Ca-전류와는 상당히 차이가 있다. 내향전류는 -40 mV부터 활성화되는데 곧 거의 최고에 이르고 막전압을 더 저분극시켜도 별로 증가하지 않았다. 최고값은 대개 $+40$ mV에서 나타났고 그 이상의 저분극 pulse에 의해서는 현저하게 감소하였다. 내향전류의 막전압에 따른 변화 즉 전류-전압 관계곡선(I-V curve)은 쥐 심실근에서 fura-2로 측정 한 Ca

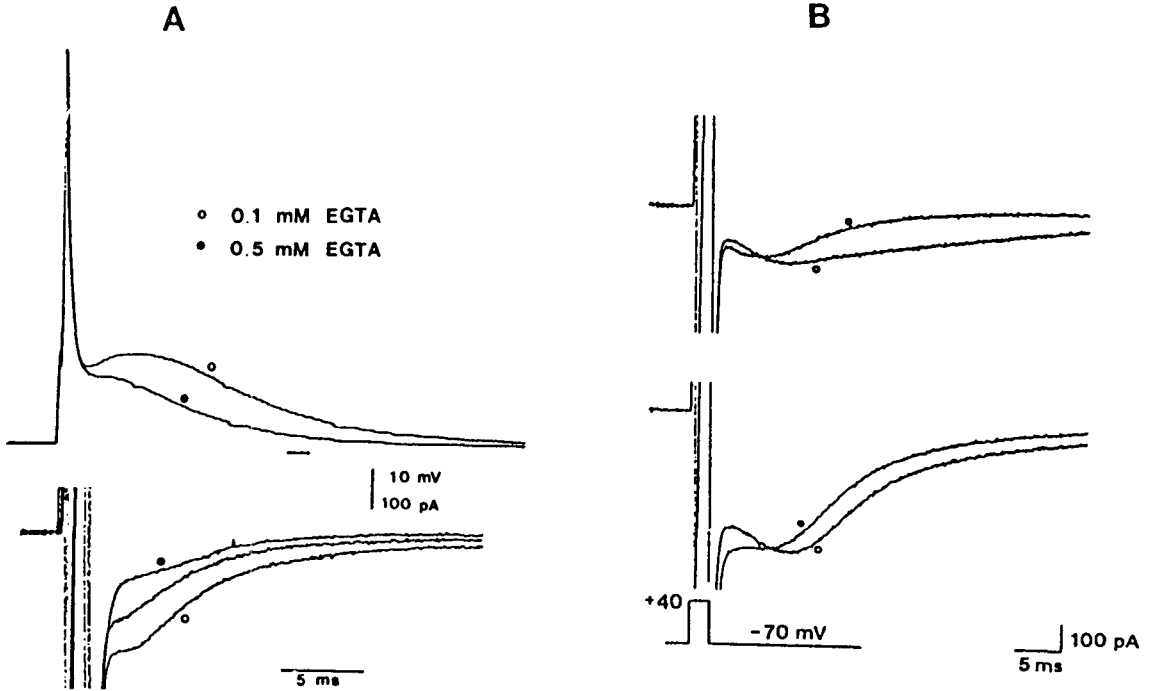


Fig. 4. The effect of intracellular EGTA on the activation of the inward current and the action potential. In A the late plateau of the action potential in 0.1 mM EGTA (○) decreased by the perfusion of 0.5 mM EGTA (●) (upper trace) and the inward current was gradually diminished by 0.5 mM EGTA (●) from 0.1 mM EGTA (○). The current was activated just after a brief pulse for 2 ms from -70 to $+40$ mV. The decrease of the inward current by EGTA was well corresponded to abolition of the late plateau. In B two records from different cells were illustrated when the currents were recorded just after the rupture of the membrane (○) and in the steady-state (●) by a depolarizing pulse from -70 to $+40$ mV for 2 ms. On diffusion of EGTA the inward current became smaller and its inactivation faster.

-transient의 I-V curve (Cannell et al, 1987)와 매우 유사하였다.

Ca-전류와 내향전류의 I-V curve가 이렇게 다른 사실로 부터 내향전류가 Ca-transient를 반영하는 것으로 생각할 수 있었다. 이러한 결과는 Ca-전류가 세포내 Ca-저장고인 SR로부터 Ca-유리를 trigger할 때 소량의 Ca-전류 성분이면 충분히 Ca-유리를 시킬 수 있고, Ca-유리에는 막전압의 저분극 또한 중요한 역할을 하며, 유리된 Ca이 Na-Ca 교환기전의 내향전류성분을 활성화시킨다는 가설 (Noble, 1984; Hilgemann & Noble, 1986; Cannell et al, 1987)을 지지하는 것으로 볼 수 있다.

1. 세포내 Ca^{2+} 농도의 영향

세포내 Ca^{2+} 농도를 바꾸어주는 실험을 하였다. Ca^{2+} 농도는 세포내 EGTA 농도를 증가시키거나, ryanodine을 처리하거나 혹은 세포내 Ca를 증가시켜 변화시켰다. 세포내 EGTA를 0.1 mM로 부터 0.5 mM로 증가시켰을 때 활동전압의 late plateau phase는 거의 소실되었다(Fig. 4A의 위 그림). 막전압고정을 하여 기록한 내향전류를 보면(Fig. 4B의 아래 그림) 0.1 mM EGTA 때 크게 활성화된 내향전류(○)가 0.5 mM EGTA로 관류하니 소실됨을 알 수 있었다. 이와 같은 내향전류의 감소는 활동전압에서 late plateau phase의 소실과 일치함을 알 수 있었고 세포내 EGTA를 5 mM로 증가시키니 내향

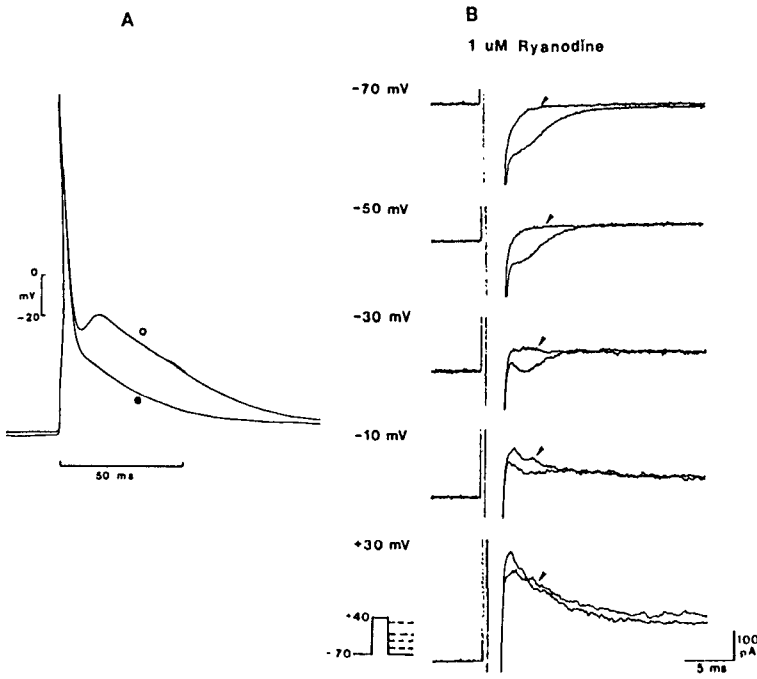


Fig. 5. Effect of ryanodine on the action potential and the inward current. A illustrates the superimposed action potential records before (○) and after (●) treatment of 1 μ M ryanodine. Ryanodine suppressed the activation of the late plateau. B shows that ryanodine abolished most of the inward current in various potentials (arrow indicated the current activation in 1 μ M ryanodine and voltage protocols are shown in inset). The duration of the pulse to +40 mV from -70 mV was 2 ms.

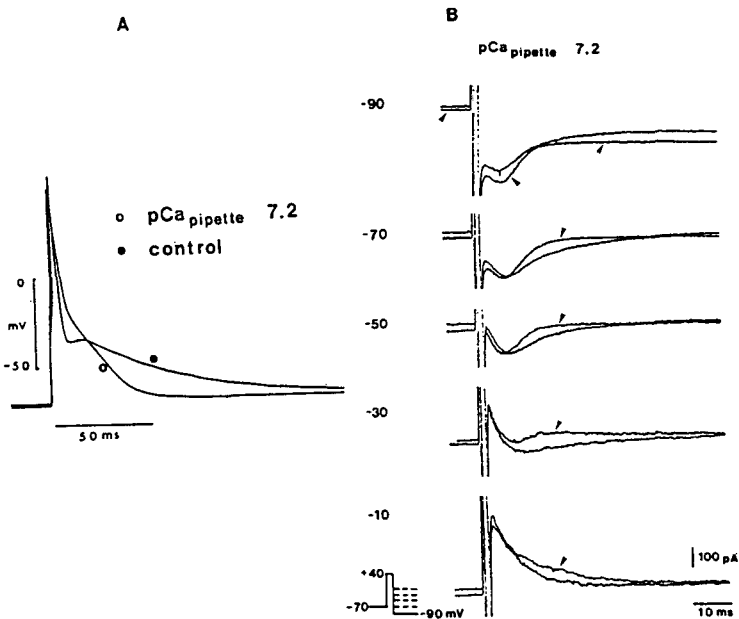


Fig. 6. Effect of intracellular Ca ($pCa=7.2$) on the action potential and the inward current. When the internal solution of the pipette was changed from Ca-free (○) to $pCa=7.2$ (●), the late plateau of the action potential was abolished and initial repolarization was slowed down (A). In B the effect of $pCa 7.2$ on the inward current is shown. The magnitude of the inward current in $pCa 7.2$ was almost similar to that in Ca-free but inactivation was facilitated in $pCa 7.2$ and the current level was shifted to the outward direction earlier than control. Voltage pulses for the activation of the inward current were shown in inset.

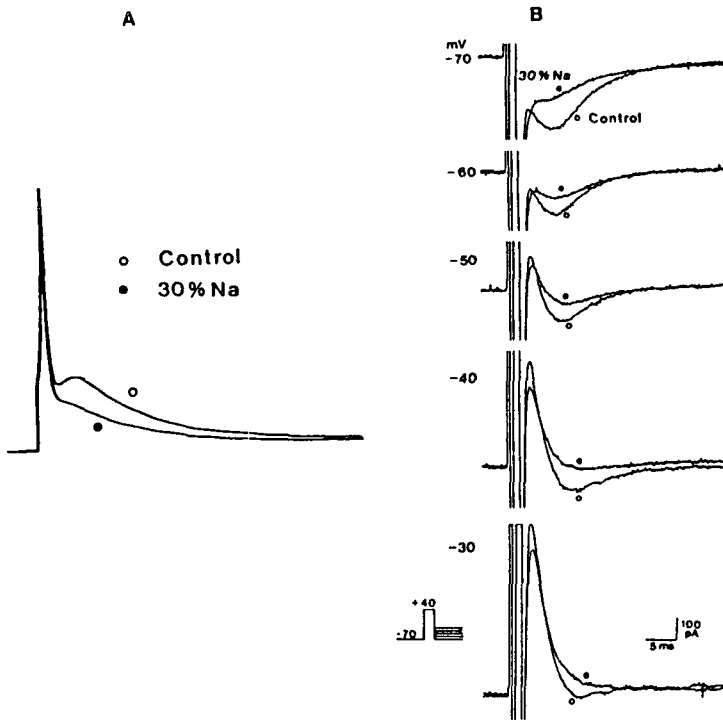


Fig. 7. Effects of extracellular sodium ion concentration on the action potential and the inward current. In low sodium solution (●) the late plateau of the action potential (A) was abolished and the inward currents (B) was diminished in various membrane potentials (open circles indicates control and filled circles are low sodium). 30% Na was replaced by equimolar lithium and voltage pulses are shown in inset of lower left corner.

전류가 완전 소실되었다(data는 도시하지 않았음). 또 0.1 mM EGTA 때도 세포막 파열 직후(○)와 시간이 지난후(●)에 내향전류의 크기가 달라졌다(Fig. 4B). 처음 기록된 전류는 비활성화가 느리게 일어났음을 알 수 있었다.

Ryanodine은 SR로부터 Ca-유리를 방해하는 물질로 알려져 있으며 쥐 심실근세포에서 느린 내향전류 tail을 감소시켰음이 보고되었다(Mitchell et al 1987). Fig. 5에 1 μM의 ryanodine이 활동전압(A) 및 내향전류(B)에 미치는 효과를 도시하였다. ryanodine은 활동전압의 late plateau 성분을 현저하게 감소시켰으며 여러 막전압에서 나타나는 내향전류를 거의 완전히 억제하였다. 위 결과는 내향전류가 SR로부터 유리되는 Ca²⁺에 의하여 활성화된다는 주장을 더욱 뒷받침하여준다. Na-Ca 교환기전의 내향전류성분이 세포내 Ca²⁺에 의하여 활성화된다는 사실에 근거하여 세포내 Ca²⁺ 농도를 높였을 때(pCa=7.2)의 효과를 검증하여 보았다. Fig. 6A는 세포내 정상 Ca²⁺ 농도의 경우와 pCa=7.2인 경우의 활동전압을 중첩시켜 나타내었다. pCa를 7.2

로 변화시키니 활동전압의 late plateau phase가 현저하게 감소, 단축되었다. 막전압고정실험에서 보면 pCa=7.2에서 내향전류의 크기에는 큰 변화는 나타나지 않았다(Fig. 6B). 그러나 pCa=7.2에서의 비활성화의 시간경과는 Ca-free의 경우에 비하여 아주 빨랐다. 이 결과는 활동전압의 변화를 바로 설명해 주지는 않는다. 아마도 활동전압 기간의 단축은 이 내향전류를 통한 변화라기 보다는 Ca²⁺에 의하여 활성화되는 background 전류 때문인 것으로 사료된다.

2. Na⁺-농도 경사의 효과

세포밖 Na⁺ 농도를 감소시키기 위해 NaCl대신 LiCl로 대체한 실험에서 활동전압의 late plateau가 줄어들고 활동전압의 기간이 단축되는 효과를 보였다(Fig. 7A). 막전압고정실험에서 내향전류는 Na⁺ 감소에 의하여 현저하게 줄었다(Fig. 7B). Na⁺ 감소효과가 활동전압의 late plateau를 줄이고 내향전류를 감소시키는 효과는 세포밖 Na⁺의 감소효과가 직접적으로 나타났기 때문일 수도 있고 혹은 Ca-전

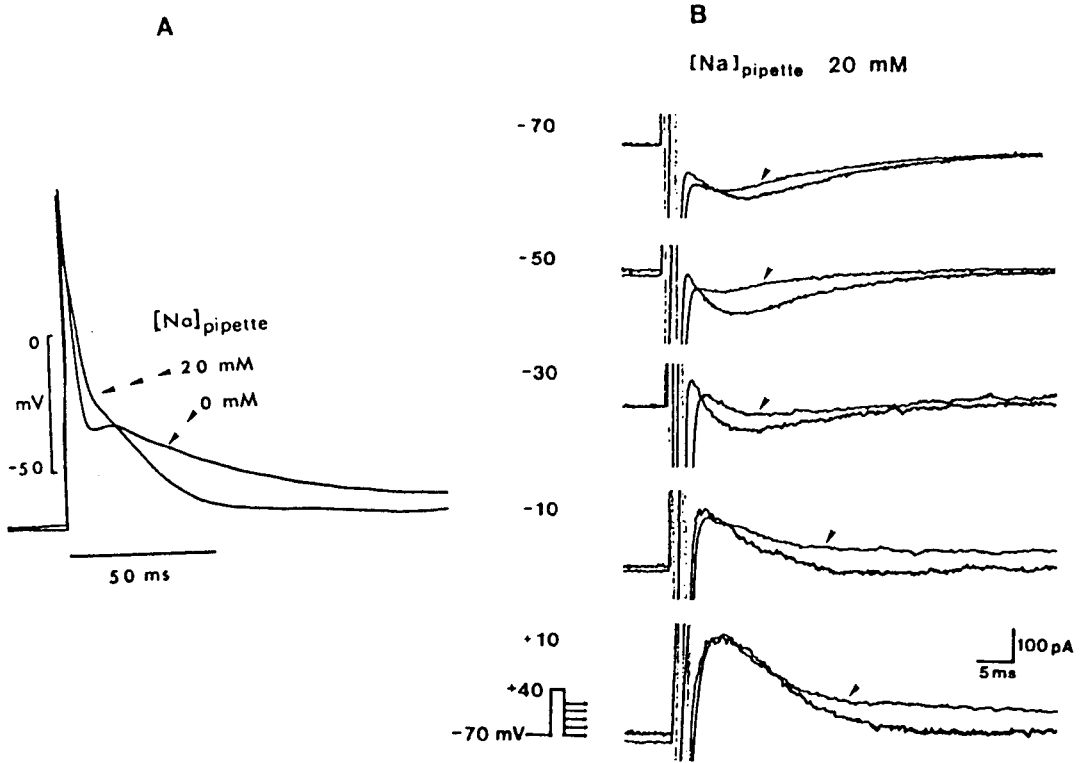


Fig. 8. Effect of increasing intracellular sodium ion concentration on the action potential and the inward current. Increasing internal sodium to 20 mM from 0 mM, the late plateau phase of action potential was abolished and the rapid repolarization was a little slowed down (A). In B the effect of 20 mM Na on the inward current activation was shown. 20 mM Na decreased the inward current in whole potential ranges. Voltage protocols are shown in the inset of lower-left corner. Arrow indicates the currents in 20 mM Na.

류가 감소하는 이차효과로 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화때문에 올 수도 있을 것이다. 그러나 쥐 심장세포에서 Ca^{2+} 대신에 Sr^{2+} 을 가하였을 때 Na-감소에 의하여 Sr-전류의 감소가 나타나지 않았고 (Mitchell et al, 1983), 또 세포내 EGTA 농도를 증가시켰을 때는 Na 감소에 의한 Ca-전류의 감소가 훨씬 적었다는 보고 (Mitchell et al, 1987) 등으로 보아 내향전류 자체가 Na^+ 에 의해 일어난다는 즉 Na^+ 농도 감소 효과가 직접적으로 나타난 것으로 해석할 수 있겠다.

또한 Li^+ 은 Na-통로를 거의 Na^+ 처럼 통과하는 성질이 있기 때문에 Na^+ 감소가 활동전압의 급속 탈분극에는 거의 영향이 없으나 Na-Ca 교환기전에는 Li^+ 이 Na^+ 대신 운반될 수 없음이 알려져 있다. 따라서 이 내향전류는 Na^+ 에 의해 운반되는 Na-Ca

교환기전의 내향전류일 것으로 여겨지고 활동전압의 plateau는 바로 이 내향전류에 의하여 유지되는 것으로 생각된다.

Na-통로를 통한 Na-전류의 효과가 내향전류에 미치는 효과를 보기 위하여 $10 \mu M$ 의 TTX (tetrodotoxin)를 투여하였으나 내향전류의 활성화에는 전혀 지장이 없었다 (실험성적은 도시하지 않았음). 이 내향전류가 Na^+ 에 의해 운반되기 때문에 세포내 Na^+ 농도변화 또한 내향전류에 영향을 줄 것으로 예상된다. 전극내 Na^+ 농도를 0 mM로부터 20 mM로 증가시켰을 때 변화를 Fig. 8에 보였다.

먼저 활동전압의 late plateau는 20 mM Na^+ 에 의해 현저히 감소하였고 (Fig. 8A), 내향전류 또한 감소하였다 (Fig. 8B). 이러한 감소는 Na^+ 에 대한 농도경사가 줄었기 때문으로 해석된다. 세포내 Na^+

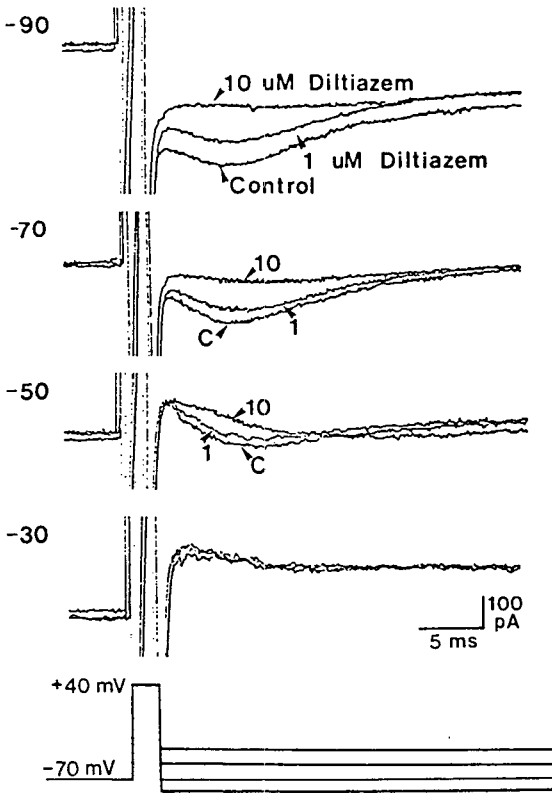


Fig. 9. Inhibition of the development of the inward current by diltiazem. $1 \mu\text{M}$ diltiazem reduced the activation of the current and $10 \mu\text{M}$ abolished the inward current completely. Voltage pulses for the current activation was shown in the bottom trace.

농도의 증가로 인한 Na-펌프의 활성화에 의하여 나타나는 외향전류의 증가효과도 고려할 수 있겠다. 그러나 Na-펌프에 의한 외향전류는 막전압이 저분극되었을 때 더욱 크고 안정막전압 상태에서는 그리 크지 않은 것으로 알려져 있다(Gadsby et al, 1985). 따라서 활동전압의 late plateau가 감소하는 현상과 내향전류가 막전압이 과분극된 경우 더욱 현저하게 감소하는 사실을 설명할 수가 없기 때문에 Na-펌프의 효과로 보기는 어려울 것 같다.

3. Ca-통로 차단제의 효과

Diltiazem 등의 Ca-통로 차단제들은 Ca^{2+} 에 의해 운반되는 통로를 선택적으로 억제하는 효과를 가지

고 있다(Lee & Tsien, 1982). 앞에서 보았던 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 내향전류는 Ca-전류를 차단하면 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 억제됨으로써 그 결과 세포내 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 전류들과 함께 모두 억제될 것으로 예상된다. 그러나 Ca-전류와 세포내 Ca^{2+} 에 의하여 활성화되는 내향전류는 서로 활성화되는 범위에 차이가 있기 때문에 Ca-전류를 일부 억제하여도 세포내 Ca^{2+} 유리에 필요한 Ca-유입은 일어날 수 있기 때문에 내향전류는 어느 정도 남아 있을 수 있다(Egan et al, 1986). 이러한 가정을 Fig. 9에서 검색하였다. Ca-통로 억제제가 존재하지 않는 상태에 활성화된 내향전류는 diltiazem $1 \mu\text{M}$ 에 의하여 완전히 억제되지 않았다. 보통 $1 \mu\text{M}$ 의 diltiazem은 거의 Ca-전류를 억제할 수 있는 양이다. Diltiazem을 거의 $10 \mu\text{M}$ 로 증가시키니 내향전류는 완전 소실되었는데 이때는 아마도 세포내 SR로부터의 Ca-유리도 완전 억제된 것으로 생각된다.

중금속 이온으로 Ca-통로를 억제하는 Ni^{2+} 의 효과를 보았다. Ca-통로를 억제하는 데는 mM 농도의 Ni^{2+} 이 필요하다. Fig. 10A에 보이듯이 $40 \mu\text{M}$ 의 Ni^{2+} 은 활동전압의 late plateau 부분을 감소시켰으며 내향전류 또한 감소시켰다. 특히 내향전류는 최고에 도달하는 시간이 크게 연장되었다(Fig. 10B). Ni^{2+} 농도를 $200 \mu\text{M}$ 로 증가시켰을 때 내향전류는 거의 억제되고 최고에 도달하는 시간도 느려졌다. 아울러 Ni^{2+} 은 Na-Ca 교환기전을 억제하고(Kimura et al, 1987) 일과성 Ca-전류를 억제함이 알려져 있다(Hagiwara et al, 1988).

이러한 결과는 내향전류가 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되고 diltiazem에 의해 Ca-통로가 차단되어도 세포내 저장고인 SR로부터 Ca-유리를 시키는데 필요한 소량의 Ca-유입만 남아있으면 상당량의 Ca^{2+} 이 유리되어 이 Ca^{2+} 에 의해 내향전류가 활성화된다는 가정을 더욱 뒷받침해준다. 이 결과는 앞에서 보인 Fig. 3A의 결과와도 잘 일치한다.

4. 내향전류의 전류-전압관계(I-V curve)

세포내 Ca^{2+} 에 의하여 활성화되는 내향전류의 I-V 관계를 알기 위해서는 여러 막전압에서 내향전류의 크기를 측정해야만 한다. 그러나 막전압이 저분극된 범위에서는 일과성 외향전류가 활성화되어

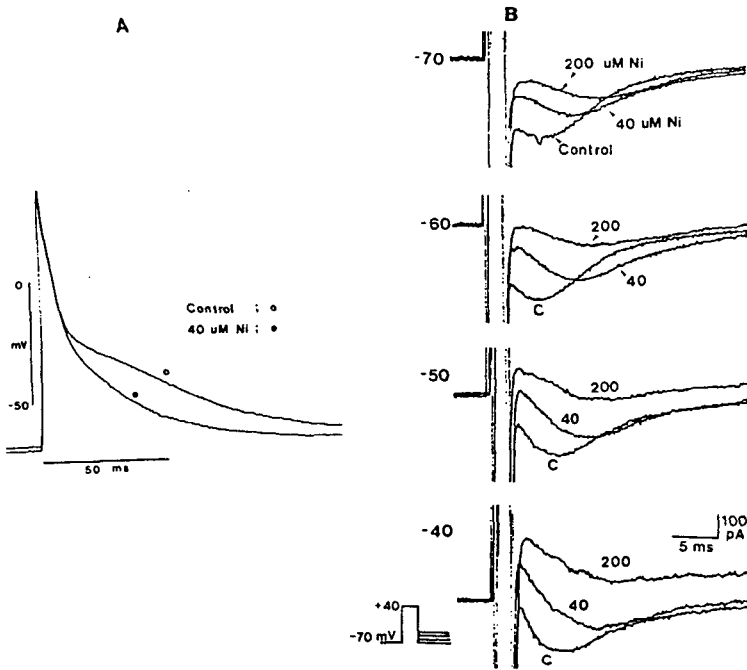


Fig. 10. Effects of nickel ion on the action potential and the inward current. In A Ni decreased the late plateau phase of the action potential (open circle indicates action potential in control and filled circle indicates that in Ni in the concentration of 40 μ M). In B nickel reduced the current and retarded time to peak activation in a dose dependent manner (40 and 200 μ M). Voltage pulses were shown in inset of lower left corner.

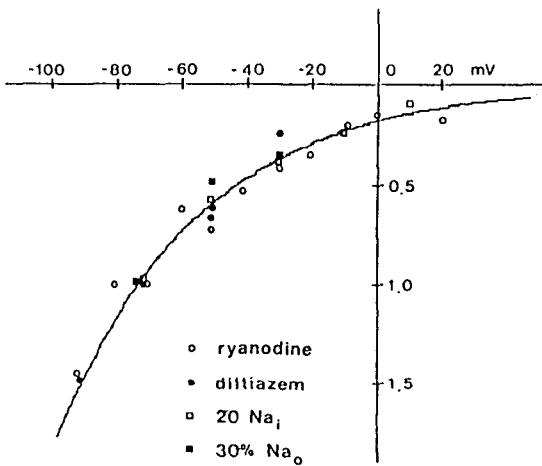


Fig. 11. Fully activated current-voltage relationship of the inward current. the difference currents between before and after the treatment of ryanodine, diltiazem, 20 mM Na_i and 30% Na_o were plotted against the membrane potential. The magnitude of the difference current was normalized and expressed as a fraction of the difference current magnitude at holding potential (usually -70 mV). The relationship turned out to be an exponential curve and showed steeper voltage dependence in more hyperpolarized potentials.

전체 전류기록이 외향방향으로 이동하거나(전극내 용액이 K^+ 이고 K-전류 억제제가 존재하지 않을 때) 혹은 내향전류의 크기가 너무 작아 측정이 어렵다(Ca^{2+} 이나 4-AP로 K-전류를 억제하였을 때). 따라서 내향전류의 크기를 ryanodine, diltiazem, 20mM Na_i , 30% Na_o 처리시 감소하는 크기로서 잡고 각각의 막전압에서 그려보았다. 내향전류의 크기가 각각 다르기 때문에 유지전압 수준에서 기록되는 전류의 크기를 기준으로 하여 분률로 표시하였다. 이렇게 하여 얻은 I-V 관계를 Fig. 11에 도시하였다.

내향전류는 막전압에 따라 지수함수적으로 변화하였다. 이론식과의 비교를 위하여 DiFrancesco & Noble (1985)의 다음과 같은 식에 대입하여 보았다.

$$i_{NaCa} = A \exp(-(1-r) EF/RT)$$

여기에서 A는 내향전류의 크기를 조절하는 scaling factor이고 r은 반응속도론(rate theory)에서 이용되는 partition parameter로서 전장내 energy barrier의 위치를 표시하는 것으로서 결국은 전류의 전압의존성의 steepness를 표시한다. E, F, R 및 T는 각각 막전압, Faraday 상수, 기체상수 및 온도를 나타낸

다. 이 식에 내향전류의 전압의존성을 대입하여 보니 $r=0.39$ 로서 0.5보다 작았다. r 이 0.5보다 작다는 것은 Na-Ca 교환기전의 내향전류 방향과 외향전류 방향이 대칭적이지 아니라는 것을 뜻하며 내향전류 때 막전압 의존성이 더욱 심하다는 것을 의미한다.

이상의 전류-전압 관계가 지수함수적인 것으로 보아 본 실험에서 기록된 내향전류는 Na-Ca 교환전류의 내향전류 성분임을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구의 주요 결론은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 의하여 내향전류가 활성화되고 활동전압의 late plateau phase에 내향전류가 관여하며 내향전류가 Na-Ca 교환전류라는 것으로 요약된다. 이와 같은 결론은 다음과 같은 실험 결과로부터 얻어진 것이다.

1) 내향전류는 짧은 저분극 pulse에 의하여 활성화되고, 시간 경과가 활동전압의 late plateau phase와 일치한다.

2) 내향전류의 막전압 의존성이 Ca-전류와는 매우 달랐다.

3) 내향전류와 late plateau 모두 세포내 EGTA, ryanodine, Na^+ 농도감소 및 Na^+ 농도증가에 의해 감소 혹은 소실되었다.

4) 내향전류는 Ca-통로 억제제인 diltiazem과 Ni^{2+} 에 의하여 억제되었다.

5) 내향전류의 전류-전압 관계는 지수함수적으로 변화였다.

내향전류의 이러한 특성은 토끼 심방근세포의 late plateau에 관여하는 전류의 성질과 비슷하고 (Hilgemann, 1986; Hilgemann & Noble, 1987) 쥐 심실근세포에서도 내향전류가 기록되어 Na-Ca 교환기전으로 생각하고 있다 (Mitchell et al, 1984b; Schouten & Ter Keurs, 1985; Mitchell et al, 1987; Hilgemann & Noble, 1987).

1. 내향전류의 시간 경과

내향전류는 10 ms 이내에 최고에 도달하고 그리고 다시 감소되는데 쥐 심실근세포에서 기록한 fura-2에 의한 Ca^{2+} -신호 (Berlin et al, 1981; Can-

nell et al, 1987)나 토끼 심방에서 tetramethylmurexide 로 측정된 세포의 Ca^{2+} -신호의 회복 (Hilgemann, 1986)에 비하여 그 시간경과가 매우 빠르다. 만약 내향전류가 세포내 Ca^{2+} -신호를 반영한다고 하면 활동전압의 late plateau는 이 내향전류로서만은 설명이 되지 않는다. 이러한 문제점은 아마도 전극내 Ca-완충제인 EGTA가 존재해서 완충작용을 했기 때문인 것으로 해석할 수 있겠다. 개 Purkinje 섬유에서 얻은 aequorin 실험결과와 fura-2를 이용하여 얻어진 Ca^{2+} -신호는 활동전압 시작과 함께 시작하여 plateau 기간 동안에 안정상태의 낮은 값으로 회복된다 (Wier & Isenberg, 1982; Berlin et al, 1981; Cannell et al, 1987). 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소는 SR에서의 reuptake와 Na-Ca 교환기전에 의한 것으로 Ca-배출은 plateau 기간 동안에 가장 활발하게 일어날 것이다.

이상의 결과들은 포유류 심장에서 Ca 유출이 활동전압 후에 일어나는 것이 아니고 활동전압 기간 동안에 일어난다는 주장을 뒷받침하여 준다. 이러한 결론은 양서류에서 느린 내향전류가 활동전압이 끝난 다음에 일어나기 때문에 Na-Ca 교환기전에 의하여 Ca 유출이 재분극후에 일어난다는 주장 (Hume & giles, 1983; Hume & Uehara, 1986)과는 상반된다. 아마도 이러한 차이는 양서류와는 달리 포유류에서는 SR로부터의 Ca-유리기전이 세포내 Ca 증가에 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 풀이된다.

2. 내향전류의 성상

내향전류가 세포내외의 Na-경사에 의하여 달라진다는 사실로부터 Na^+ 이 내향전류를 일으키는 이온이라는 사실을 짐작할 수 있다. 이러한 전류기전으로서 두가지 가능성을 짐작할 수 있다.

첫째는 전류발생적인 Na-Ca 교환기전일 가능성 (Mullins, 1979, 1981; Kimura et al, 1986; Mechmann & Pott, 1986; Kimura et al, 1987; Fedida et al, 1987)과 둘째로는 비선택적인 양이온 통로 (non-selective cation channel) (Colquhoun et al, 1981)를 통한 가능성이다. 1986년 Mechmann & Pott는 atrial myoball에 patch-clamp를 하여 이러한 가능성을 검증하였다. 그 결과 Na-Ca 교환기전을 활성화

시키는데 필요한 Ca^{2+} 농도는 비선택적인 양이온 통로를 활성화시키는데 필요한 Ca^{2+} 농도보다 낮고 하였다. 본 실험결과에서 보듯이 세포밖 Na^+ 농도를 Li^+ 로 대체하여 감소시켰을 때 내향전류가 감소하였는데 Li^+ 은 Na-통로나 비선택적 양이온 통로를 통과할 수 있으나 Na-Ca 교환기전에 의해서는 운반될 수 없는 사실로 보면 내향전류가 Na-Ca 교환일 가능성이 더 높다고 생각한다.

3. Ca^{2+} 의 유입과 유출

본 실험에서 사용된 단일 심방세포의 용적은 6.4 ± 1.1 pL 정도였으며, 세포의 용액의 Ca^{2+} 농도는 1.8 mM이었다. 이러한 상태하에서 Ca^{2+} 전류의 최대치는 350 ± 45 pA의 범위에 있었으나 내향전류의 최대치는 -40 mV에서 157 ± 13 pA의 범위에 있었다. Na-Ca 교환기전의 stoichiometry는 3:1이므로, Ca-통로를 통하여 들어온 Ca^{2+} 을 모두 교환기전에 의해 퍼낸다고 해도 그 전하량은 Ca-통로를 통해 들어온 전하량의 50%에 지나지 않을 것이다. 그리고 Ca^{2+} 유출(내향전류)이 일어나는 기간(30 ms)은 Ca^{2+} 유입이 일어나는 기간(15 ms)에 비해 두배 가량 길다. 따라서 일정량의 전하를 운반하려면 전류가 1/2이 되어야 한다. 이상의 사실로부터 내향전류의 최대치는 Ca-전류의 최대치의 25% 정도이라 짐작할 수 있다. 실제로 활동전압의 late plateau phase (-40 mV)에서 최대 내향전류는 최대 Ca-전류의 45% 정도되었다. 이것은 세포막을 통한 Ca^{2+} 조절에 교환기전이 중요한 역할을 할 것이라는 가설에서 예측한 것보다 많은 양이다. 그 이유는 항 정상상태에서는 Ca^{2+} 의 유입과 유출이 같은 양이 되어야 하지만 본 실험에서는 아주 낮은 빈도로 자극을 했기 때문에 Ca-통로를 통한 유입이 활동전압 중의 Na-Ca 교환기전을 통한 유출과 같지 않았던 것으로 추측된다.

4. 내향전류의 전류-전압 관계

내향전류의 전압 의존성은 다음의 두가지 방법으로 알아볼 수 있다. 첫번째 방법은 $+40$ mV의 짧은 pulse를 준 다음 여러 막전압으로 재분극을 시키는 것이다. 이런 pulse protocol을 사용하면 내향전류의 최대 활성화(activation)와 그 전압 의존도

(voltage dependence)를 알 수 있다. 두번째 방법은 여러가지 수준의 저분극 pulse를 2 ms동안 준 다음 유지전압 수준으로 다시 재분극시키는 것이다. 이 방법을 사용하여 구한 내향전류의 전압 의존도는 SR로부터의 Ca-유리의 전압의존도를 반영하는 것이다.

Na-Ca 교환기전의 전압의존도는 방사선 동위원소를 사용한 실험을 통해 알려져 있다. 세포의 Na 의존성 Ca의 유출은 세포막 저분극에 의하여 감소되고 과분극에 의하여 증가됨이 오징어의 신경세포 (Blaustein et al, 197; Mullins & Brinely, 1975; Dipolo et al, 1985)와 소의 심장근세포 vesicle (Reeves & Hale, 1984)에서 알려져 있다. Noble (1986)은 Eyring의 rate theory에서 사용되는 r (partition parameter)을 도입하여 Na-Ca 교환전류를 $\exp(rEF)$ 의 함수로 나타내었다.

r 이 0.5라면, 교환율이 안쪽 방향과 바깥쪽 방향간에 대칭적임을 뜻한다. 첫번째 방법을 사용하여 실험을 한 결과(Fig. 10), 내향전류의 전류-전압 곡선은 지수함수적인 관계를 보였으며 r 은 $0.39(1-r=0.61)$ 이었다. 이 사실은 Na-Ca 교환기전이 비대칭적이며 내향성분이 더욱더 전압의존적임을 나타낸다. 이 결과는 guinea-pig의 단일 심실근세포에서 patch clamp를 행하여 얻은 결과와 유사하다 (Kimura et al, 1987). 두번째 방법을 사용하여 실험을 한 결과 -50 mV 이하에서는 내향전류 성분이 거의 기록되지 않았지만 -40 mV 이상에서는 거의 최대치의 내향전류 성분이 활성화되었다. 내향전류의 전류-전압 관계는 Ca-전류와는 다른 전압의존도를 보였다. 이 결과로 미루어 볼 때 내향전류 성분은 소량의 Ca-전류만으로도 활성화 될 수 있으리라 생각되며, 만약 내향전류 성분이 SR로부터의 Ca-유리에 의하여 활성화된다고 한다면, Ca-유리는 Ca의 유입에 의한 기전외에 그 자체가 직접 전압에 의해 영향을 받을 가능성이 있다 (Cannell et al, 1987).

마지막으로 본 실험의 결과로부터 심근의 SR에서 Ca이 유리되는 기전을 생각해 볼 수 있다. Ca^{2+} 유리는 소량의 Ca-전류에 의하여 활성화된 후 regenerative하게 일어나리라고 생각되며, Ca^{2+} 자체는 단독으로 작용하는 것이 아니라 유리기전중 하나의

인자라고 생각된다. 또한 골격근에서와 같이 세포막의 저분극 또한 Ca-유리를 일으키는데 관여하리라 생각된다(Rios & Brum, 1987).

결 론

토끼 단일 심방근세포에서 whole cell clamp technique 및 intracellular perfusion technique을 이용하여 활동전압의 late plateau phase에 관여하는 내향전류를 분리 기록하고 내향전류의 전기생리학적 특성을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 내향전류는 유지전압 $-70 \sim -80$ mV로 부터 $+40$ mV까지 2 ms동안 막전압 pulse를 준 후 활성화 되었으며 활동전압의 late plateau phase의 시작과 시간경과가 비슷하였다. 내향전류는 pulse를 준 후 5~10 ms 후에 나타났으며 저절로 비활성화되었는데 그 시간경과는 비교적 느리게 나타났다.

2) 내향전류는 되돌아오는 막전압 크기에 따라 활성화되는 크기가 달라졌는데 과분극 쪽에서 크고 저분극 범위에서는 감소하였다. -40 mV 이상의 막전압에서는 일과성 외향전류의 활성화로 내향전류를 잘 볼 수 없었으나 Cs⁺이나 4-aminopyridine으로 외향전류를 억제한 후에는 분명하게 나타났다.

3) 내향전류의 활성화는 $+40$ mV까지의 pulse 기간이나 유지전압에 따라서 달라졌다. 전류-전압 관계도 Ca-전류와는 달라서 -40 mV 이상의 pulse에 의해서는 거의 최대로 활성화가 일어났으나 Ca-전류의 전류-전압 곡선은 -40 mV에서 시작하여 점차 커지다가 $+10$ mV 이상에서 다시 감소하는 종(bell) 모양의 관계를 보였다.

4) 세포내 EGTA 농도가 증가하면 활동전압의 late plateau와 내향전류는 감소하였고 비활성화 시간경과도 빨라졌다. 내향전류와 late plateau phase는 $1 \mu\text{M}$ ryanodine에 의하여 소실되었고 세포내 Ca 농도가 $p\text{Ca}=7.2$ 로 증가하였을 때는 late plateau는 감소하였으나 내향전류의 크기는 크게 감소하지 않았고 비활성화시간이 단축되었다.

5) 세포외 Na⁺ 감소(30% Na)와 세포내 Na⁺ 증가(20 mM Na)는 모두 late plateau와 내향전류를 감소시켰다.

6) Diltiazem $1 \mu\text{M}$ 은 내향전류 일부를 억제하였

고 $10 \mu\text{M}$ 은 완전 소멸시켰다. Ca-전류와 Na-Ca 교환기전을 억제하는 Ni²⁺은 $40 \sim 200 \mu\text{M}$ 의 낮은 농도에서 활동전압의 late plateau를 감소시켰고 내향전류의 활성화를 감소 및 지연시켰다.

7) 최대로 활성화된 내향전류의 전류-전압 관계는 ryanodine, diltiazem, 20 mM Na_i 및 30% Na_o 처리 전후의 전류 차이를 막전압에 따라 표시하였다. 전류-전압 관계는 지수곡선을 나타내었는데 과분극 범위에서는 크고 저분극 범위에서 작은 모양을 보였다. 이 지수곡선은 $i = A \exp(-(1-r)EF/RT)$ 라는 Na-Ca 교환기전을 나타내는 식에 잘 맞았다. 이때 $r=0.39$ 였다.

이상의 결과는 내향전류가 활동전압의 late plateau에 관여하며, Ca-전류에 의하여 촉발되는 근장그물에서의 Ca-유리에 의해 활성화됨을 시사한다. 따라서 내향전류는 Na-Ca 교환기전의 내향성분으로 생각하였다.

REFERENCES

Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M & Ojeda C (1979). The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 379, 137-229

Beeler JR GW & Reuter H (1970). The relation between potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. *J Physiol* 207, 211-229

Berlin Jr, Cannell MB & Lederer WJ (1981). Voltage-dependence of the Ca transient in rat cardiac ventricular cells measured with fura 2. *J Physiol* 382, 108P.

Blaustein MP, Russell JM & De Weer P (1974). Calcium efflux from internally dialyzed squid axons: the influence of external and internal cations. *J Supramol Structure* 2, 558-581

Cannell Mb, Berlin JR & Lederer WJ (1987). Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* 238, 1419-1423

Clark RG, Giles WR & Imaizumi Y (1988). Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol* 405, 147-168

- Colquhoun D, Neher E, Reuter H & Stevens CF (1981). Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 294, 752-754
- DiFrancesco D & Noble D (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philosophical Trans Royal Soc B* 307, 353-398
- Dipolo R, Bezanilla f, Caputo C & Rojas H (1985). voltage dependence of the Na/Ca exchange in voltage-clamped, dialyzed squid axons. *J Gen Physiol* 86, 457-478
- Earm YE & Irisawa H (1986). Effects of pH on the Na/Ca exchange current in single ventricular cells of the guinea pig. *Japanese Heart J* 27(Supple I), 153-158
- Egan T, Noble D, Noble SJ, Powell T & Twist VW (1986). Separation of calcium and $[Ca]_i$ -activated current in guinea-pig and rabbit ventricular cells. *J Physiol* 381, 94 P.
- Fedida D, Noble D, Shimoni & Spindler AJ (1987). Inward current related to contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 385, 565-589
- Gadsby DC, Kimura J & Noma A (1985). Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* 315, 63-65
- Giles WR & Imaizumi Y (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 405, 123-145
- Hagiwara N, Irisawa H & Kameyama M (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 395, 233-253
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv* 395, 6-18
- Hilgemann DW (1986). Extracellular calcium transients and action potential configuration changes related to post-stimulatory potentiation in rabbit atrium. *J Gen Physiol* 87, 675-706
- Hilgemann DW & Noble D (1986). Calcium movements during cardiac electrical activity: correlation of net fluxes with ionic currents. *Proc Satellite symposium IUPS*.
- Hilgemann DW & Noble D (1987). Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transients in rabbit atrium: Reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc Royal Soc B* 230, 163-205
- Hume JR & Giles WR (1983). Ionic currents in single isolated bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 81, 153-194
- Hume JR & Uehara A (1985). Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J Physiol* 368, 525-544
- Hume JR & Uehara A (1985). 'Creep currents' in single frog atrial cells may be generated by electrogenic Na/Ca exchange. *J Gen Physiol* 87, 857-884
- Isengerg G & Klöckner U (1982). Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Archiv* 395, 30-41
- Kass RS & Wiegers SE (1982). The ionic basis of concentration-related effects of noradrenaline on the action potential of calf cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 322, 541-588
- Kimura J, Noma A & Irisawa H (1986). Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 319, 596-597
- Kimura J, Miyamae S & Noma A (1987). Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 384, 199-222
- Lee KS, Noble E, Lee E & Spindler AJ (1984). A new calcium current underlying the plateau of the cardiac action potential. *Proc Royal Soc B* 223, 35-48
- Lee KS & Tsien RW (1982). Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. *Nature* 497, 498-501
- Matsuda H & Noma A (1984). Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 357, 553-573
- Mechmann S & Pott L (1986). Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 319, 597-599
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1983). Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc Royal Soc B* 219, 447-469
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1984 a). Strontium, nifedipine and 4-aminopyridine mod-

- ify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *British J Pharmacol* 81, 551-556
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist TW (1984b). The effects of ryanodine, EGTA and low-sodium on action potentials in rat and guinea-pig ventricular myocytes; evidence for two inward currents during the plateau. *British J Pharmacol* 81, 543-550
- Mitchell Mr, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1984c). The use of isolated mammalian cardiac myocytes for the study of inotropic mechanisms. In: Paton WDM, Mitchell JF and Turner P (ed) *Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology* Vol 2, macmillan, London, p 13-19
- Michell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1987). Calcium-activated inward current and contraction in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 391, 545-560
- Mullins LJ (1979). The generation of electric current in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am J Physiol* 236, C 103-110
- Mullins LJ (1981). *Ionic Transport in Heart*. Raven Press, New York.
- Mullins LJ & Brinley Jr FJ (1975). Sensitivity of calcium efflux from squid axons to changes in membrane potential. *J Gen Physiol* 65, 135-152
- Noble D (1984). The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 353, 1-50
- Noble D (1986). Sodium-calcium exchange and its role in generation of electric current. In: Nathan R (ed) *Cardiac Muscle: the Regulation of Excitation and Contraction*, New York p 171-200
- Reeves JP & Hale CC (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* 259, 7733-7739
- Rios E & Brum G (1987). A possible role of dihydropyridine receptor molecules in excitation-contraction coupling. *Nature* 325, 717-720
- Schouten VJA & Ter Keurs HEDJ (1985). The slow repolarization phase of the action potential in rat myocardium. *J Physiol* 360, 13-25
- Soejima M & Noma A (1981). Mode of regulation of the Ach-sensitive K-channel by the muscarine receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Archiv* 400, 424-431
- Wier WG & Isenberg G (1982). Intracellular Ca transients in voltage clamped cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Archiv* 393, 282-290