

토끼 심방근에서 Na-Ca 교환 전류에 대한 Bay K, cAMP, Isoprenaline 효과

서울대학교 의과대학 생리학교실

호 원 경 · 엄 용 의

(1990년 11월 5일 접수)

= Abstracts =

Effects of Bay K, cAMP and Isoprenaline on the Na-Ca Exchange Current of Single Rabbit Atrial Cells

Won Kyung Ho and Yung E Earm

Department of Physiology, Seoul National University College of Medicine

Ca movements during the late plateau phase in rabbit atrium implicate Na-Ca exchange. In single atrial cells isolated from the rabbit the properties of the inward current of Na-Ca exchange were investigated using the whole cell voltage clamp technique. The inward currents were recorded during repolarization following brief 2 ms depolarizing pulse to +40 mV from a holding potential of -70 mV.

Followings are the results obtained:

- 1) When stimulated every 30 sec, the inward currents were activated and reached peak values 6~12 ms after the beginning of depolarizing pulse. The mean current amplitude was 342 pA/cell.
- 2) The current decayed spontaneously from the peak activation and the timecourse of the relaxation showed two different phases: fast and slow phase.
- 3) The recovery of the inward current was tested by paired pulse of various interval. The peak current recovered exponentially with a time course similar to that of Ca current recovery.
- 4) Relaxation timecourse was also affected by pulse interval and time constant was reduced almost linearly according to the decrease of pulse interval between 30 sec and 1 sec.
- 5) The peak inward current was increased by long prepulse stimulation, Bay K, isoprenaline or c-AMP.
- 6) The relaxation time constant of the inward current was prolonged by Bay K or c-AMP, and shortened by isoprenaline.

From the above results, it could be concluded that increase of the calcium current potentiates and prolongs intracellular calcium transients, while shortening of the timecourse by isoprenaline or short interval stimulations might be due to the facilitation of Ca uptake by SR.

Key Words: Whole cell voltage clamp technique, Inward current of Na-Ca exchange, Ca transient, SR, Ca uptake

*이 논문은 1989년도 문교부 학술연구조성비 및 1990년도 서울대학교 병원 특진연구비에 의하여 연구되었음.

서 론

심장이 주기적인 수축작용으로 펌프의 기능을 수행하기 위하여는 세포내 Ca 농도가 주기적으로 조절되어야 한다. 세포내 Ca은 활동전압시 활성화된 Ca 통로를 통한 Ca 유입과 근장그물에서의 Ca 유리에 의하여 급격히 증가하고, Na-Ca 교환기전과 Ca 펌프를 통한 세포밖으로의 배출 및 근장그물로의 재흡수에 의하여 감소한다. 심근세포막의 Ca-펌프는 낮은 농도에서 포화되고 그 속도가 늦으므로 (Caroni and Carafoli, 1981) 세포 밖으로의 Ca 배출에 Na-Ca 교환기전이 중심적 역할을 하는 것을 생각되고 있다.

심근에 Na과 Ca이 교환되는 기전이 존재함은 1958년 Luttgau와 Niedrigerke가 개구리심장에서 수축의 크기를 결정짓는데 있어 Na과 Ca이 서로 길항적으로 작용함을 발견함으로써 처음 제시되었고 Reuter와 Seitz(1968)가 세포밖 Na에 의존하는 Ca의 efflux를 측정함으로써 증명되었다. 그 후로 많은 학자들이 방사성동위원소로 flux를 측정하여 Na-Ca 교환기전의 특성을 연구(Langer, 1982; Philipson, 1985)하여, 그 교환 비율이 3Na : 1Ca로서 전류발생적 (electrogenic)이라는 결론에 도달하였다.

Mullins(1981)는 교환비율을 3 : 1로 하여 교환전류를 구하는 모델을 제시하였고, 그 모델을 근거로 심장의 활동전압을 이루는데도 중요한 역할을 할 것임을 주장하였으나 실험적으로 Na-Ca 교환전류가 기록된 것은 아주 최근의 일이다. 1987년 Kimura 등은 guinea-pig의 단일 심실근 세포에서 막전압 고정법 (voltage clamp)과 세포내 관류법을 이용하여 다른 이온통로를 모두 억제한 상태에서 Na과 Ca의 농도 경사에 따라 내향 또는 외향으로 흐르는 전류를 기록하고 그 전류전압 관계가 Mullins의 모델에 잘 일치함을 밝혔고(Kimura et al, 1986; 1987), Mechmann과 Pott(1986)는 caffeine으로 처리하여 근장그물에서 Ca 유리를 일으킬 때 나타나는 내향전류를 기록하고 이것이 Na-Ca 교환전류임을 밝혔다. 이들의 실험은 직접적으로 교환전류를 기록했다는 데는 의미가 있으나 생리적인 상태에서 이루어진 것이 아니므로 생리적인 상태에서 Na-Ca 교환

전류의 크기, kinetics 및 역할을 측정하는 데에 큰 도움을 주지는 못하였다.

실제 활동전압에 Na-Ca 교환기전이 역할을 하리라 하는 실험적 근거는 활동전압의 재분극이 빠른 시기와 느린 시기의 두 부분으로 구별되는 쥐의 심실근과 토끼의 심방근에서 많이 연구되었다. Mitchell 등(1984a; 1984b)은 쥐의 심실근에서의 late plateau 성분이 ryanodine, EGTA나 세포 밖 Na 감소에 의해 억제되는 실험으로 세포내 Ca에 의해 활성화 되는 내향전류가 관여함을 보여주었다. Hilgemann(1986)은 토끼의 심방근에서 활동전압 및 수축과 함께 세포밖 Ca transient를 측정함으로써 활동전압의 초기에 세포 밖 Ca이 감소하였다가 late plateau 시기에 다시 보충됨을 관찰하여 그 시기에 세포 밖으로의 Ca 유출(extrusion)이 일어남을 증명하였고, 또한 이 late plateau 발생을 억제하는 여러 조건이 세포 밖 Ca transient에도 동일한 영향을 미침을 밝혀 late plateau 형성에 Na-Ca 교환기전이 작용함을 보였다. 이는 생리적 상태에서 Na-Ca 교환에 의한 Ca 이동량에 관한 양적 자료를 제시해 주는 것으로서, 1987년 Hilgemann과 Noble은 이 결과를 근거로 활동전압과 수축의 세포기전에 관한 재구성(reconstruction)을 하였다. 한편 개구리의 심방근(Hume & Uehara, 1986a; Hume & Uehara 1986b; Campbell et al, 1988)이나 guinea-pig의 심실근(Fedida et al, 1987)에서 Ca-전류를 발생시키는 저분극 pulse후에 기록되는 'slow tail'이 Na-Ca 교환전류일 것이라는 증거들이 제시되었다.

Earm 등(1990)은 토끼의 단일 심방근에서 +40 mV로 2 ms 기간의 짧은 pulse를 준 후 일과성으로 내향전류가 활성화되는 것을 기록하였다. 그 전류는 세포내 Ca transient에 의해 활성화되고 Na 경사에 의존적이며 전압의존성이 지수함수적(exponential)이어서 Na-Ca 교환전류로 생각되었으며, 또한 ryanodine에 의하여 거의 완전히 억제되었으므로 세포내 Ca transient가 근장그물에서의 Ca 유리 및 재흡수에 크게 의존적인 것으로 생각된다. 이에 저자는 Earm 등의 방법으로 Na-Ca 교환전류를 기록하여 그 기본적인 특성을 밝힌 후, 심근 수축에 영향을 주는 여러 조건 즉 자극빈도의 변화, Bay K, c-AMP, isoprenaline들의 영향을 비교분석하여 이

들이 세포내 Ca 농도 조절에 어떠한 기전으로 작용하는가를 추구해 보고자 하였다.

연구 방법

1. 토끼 단일 심방근의 분리

대동맥에 catheter를 넣어 Langendorff perfusion을 한 상태에서 Ca free Tyrode 용액으로 5분간 관류한 후 collagenase (20 mg/50 ml, Sigma type I)가 함유된 low Ca-Tyrode 용액 (Ca 농도 : 30~50 μ M)으로 10~15분 관류시킨 다음 심방부분을 떼어 내어 잘 흔들어 주고 떨어져나온 세포들을 low Cl, high K 저장용액에 넣어 4°C에 보관하였다.

실험용액은 정상 Tyrode 용액 (mM) ; NaCl, 140; KCl, 5.4 ; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.33; glucose, 5; HEPES, 5 (pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추었다)이고, 전극내 용액 (mM) ; K-aspartate, 100; Mg-ATP, 5; di-Tris-creatine phosphate, 5; MgCl₂, 1; KCl, 20; HEPES, 5 (pH는 KOH로 적정하여 7.4로 맞추) ; EGTA, 0.1이었다.

2. Voltage clamp

유리전극은 tip 저항이 2~3 M Ω 인 것을 사용하였다. 심방근 세포를 inverted microscope 상에 설치한 실험용기에 옮긴 후 실험용액을 1 ml/min의 속도로 관류하며 용기내 온도를 35°C로 유지하며 실험하였다. 유리전극을 전극내 용액으로 채운 후 세포막에 접근시키고 -10~-20 cmH₂O의 음압을 가하여 giga seal을 만든 후 음압을 높여 세포막을 파열시킨 상태에서 whole cell voltage clamp를 하였다 (Hamill et al, 1981). Na-Ca 교환전류를 보기 위하여는 Earm 등 (1990)의 방법으로 -70 mV에서부터 +40 mV로 2 ms의 짧은 pulse를 준 후 -70 mV에서 활성화되는 내향전류를 기록하였다. 내향전류는 자극을 주는 양상에 따라 큰 차이를 보이므로 30초 간격으로 일정한 자극을 계속 주는 상태에서의 기록을 control로 잡았다. 자극 간격에 따른 변화를 보기 위한 실험에서는 control을 계속 기록하는 사이에 서로 다른 간격의 paired pulse를 주었고, 다른 조건으로 넘어 가기 전에 적어도 2번 이상의 control을 기록하였다. 실험결과는 digital oscilloscope (Hitachi, 6041

혹은 Nicolet 9024)와 펜 기록기 (Harvard oscillograph)에 기록하며 동시에 PCM data recorder (NF 880)에 저장하였다가 나중에 분석하였다.

연구 성적

1. Na-Ca 교환전류의 시간경과

Holding potential -70 mV에서 +40 mV까지의

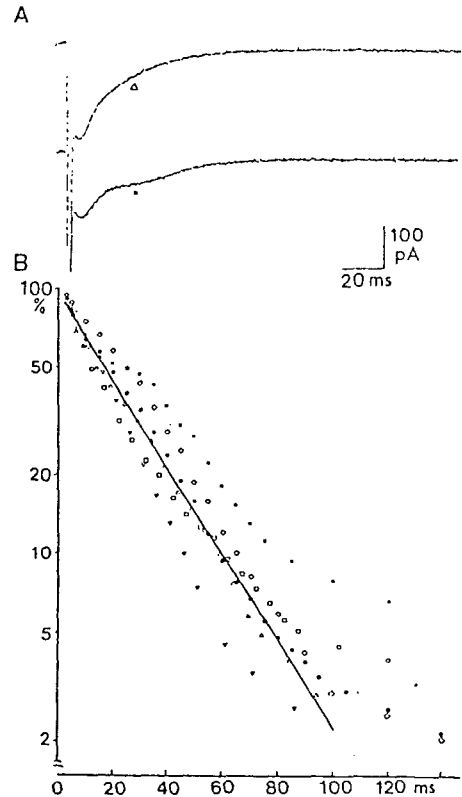


Fig. 1. A. Two examples of the inward current recorded at -70 mV after depolarizing the membrane to +40 mV for 2 ms. Usually the inward current relaxed smoothly like the upper trace, but in some cases two or more component could be seen like the lower trace. B. The timecourse of the current relaxation was plotted on a semilog scale. Different symbols represent the results obtained from different cases. Open triangle is obtained from the upper trace in A and can be fitted with a straight line. Filled square is from the lower trace in A and shows a later slower-component.

저분극 pulse를 2 ms동안 준 후 다시 -70 mV로 재분극시켰을 때 일과성으로 나타나는 내향전류의 기록을 Fig. 1A에서 대표적인 두 예를 보이고 있다. 자극의 간격은 30초로 하였고, 앞으로 전 실험에서 30초 간격의 자극에서의 기록을 항정상태에서의 기준으로 하였다. 빠른 capacitive current후 내향전류가 나타나는데 그 크기가 점점 커져서 6~12 ms후에 (mean S.D=9.0 1.8 ms, n=15) 최대치에 이르렀고, 최대전류의 크기는 200 pA-400 pA였다 (mean±S.D=342±59 pA, n=15). 최대치에 이른 후 내향전류의 크기는 서서히 감소하였는데, 이 감소하는 양상을 Fig. 1B에서 semilog plot을 하였다. 최대치에 이르는 시점을 시작점 (zero time)으로 하였고 서로 다른 예를 각기 다른 기호로 표시하였다. 전반부에 10~30 ms의 시정수로 직선적으로 감소하는 부분과 후반부에 아주 느리게 감소하는 부분으로 나눌 수 있었으며, 후반부 느린 성분의 크기는 세포에 따라 차이가 많았다. Fig. 1A의 위의 경우와 같이 느린성분의 크기가 작은 경우는 거의 single exponential로 감소하여 semilog plot에서 거의 직선에 맞는 것으로 보였다(Fig. 1B의 세모). 그러나 아래의 경우와 같이 느린성분의 크기가 큰 경우에는 두 성분이 뚜렷이 구분되었다(Fig. 1B에 검은 네모로 표시).

2. 자극간격이 내향전류의 크기 및 시간경과에 미치는 영향

자극간격의 변화가 심근의 수축력에 중대한 영향을 미치는은 오래전부터 잘 알려져 왔으나 그 양상은 조직에 따라 차이가 많고 그 기전은 아직 확실치 않다. 따라서 세포내 Ca에 의해 활성화 된다고 생각되는 Na-Ca 교환기전에 의한 내향전류가 자극간격에 의해 어떻게 영향을 받는가를 봄으로써, 이 내향전류가 세포내 Ca의 역동적 변화를 실제로 잘 반영할 수 있음을 확인하고 나아가 자극간격과 세포내 Ca 농도 조절과의 관계를 알아보고자 하였다. +40 mV, 2 ms 기간의 자극 pulse를 그 간격을 바꾸며 두 개씩 pair로 주어 두번째 pulse에 의한 Na-Ca 교환전류를 서로 비교하여 자극간격(interval)이 교환전류에 미치는 영향을 살펴보았다. 이 실험에서는 paired pulse의 간격을 바꾸기 전에 반드시 30초 간

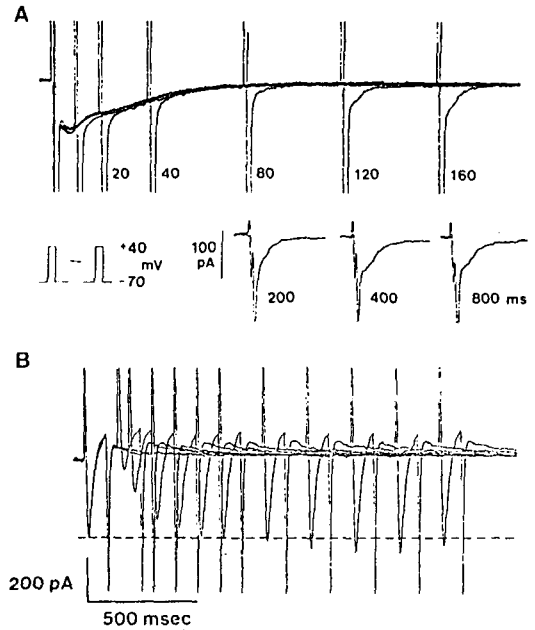


Fig. 2. The recovery of the the inward current (A) and Ca current: (B). A) Paired pulses of various intervals (20, 40, 80, 120, 160, 200, 400, 800 ms) were applied every 30 seconds and the inward currents were superimposed in upper trace to show the recovery of the inward current activated by second pulses as increasing the pulse interval. In lower trace the inward currents activated by second pulse were shown. Left lower inset shows pulse protocol. B) The Ca current was activated by depolarizing pulse to +10 mV for 100 ms from the holding potential of -40 mV. The currents obtained by paired pulse were superimposed.

격의 기준자극을 여러번 주어 일정한 전류가 기록됨을 확인한 후에 실험자극을 가하였다. Fig. 2A에서 30초 간격으로 한 번씩 자극했을 경우의 기준 기록과 여러 간격의 자극에서 두번째 pulse에 의한 전류를 겹쳐서 보이고 있다. Capacitive current와 교환전류의 경계를 정확히 구분짓기는 어려우나, 자극간격을 점차 늘임에 따라 capacitive current의 extrapolation과는 차이가 나는 내향전류성분이 점차 증가하여 400 ms후에 그 최대치에 거의 도달함을 볼 수 있었다. Fig. 2B에서는 이를 Ca 전류 회복경과와 비교하기 위하여 유지전압 -40 mV에서 +10

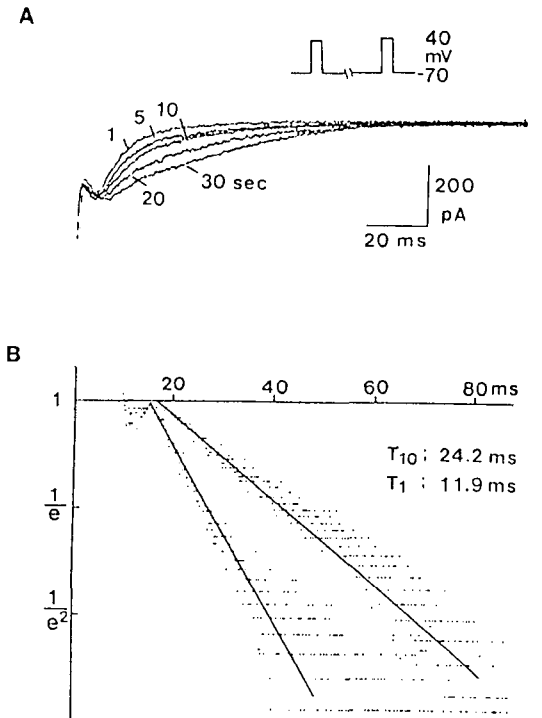


Fig. 3. The effect of stimulation interval on the relaxation of the inward current. A) 1, 5, 10, 20, 30 sec indicated the stimulation interval. The current relaxations become faster as the stimulation intervals were shortened. B) Comparison of the timecourses of the inward currents obtained at 10 sec and 1 sec interval in a semilogplot.

mV로 여러 간격의 paired pulse를 주며 Ca 전류를 기록한 것을 겹쳐서 그려 보았다. Ca 전류 또한 400~500 ms 후에 거의 회복되었으므로 이 둘의 회복 경과가 유사한 것으로 보였고, 따라서 짧은 간격의 자극에서 보이는 내향전류 최대치는 Ca 전류의 최대치와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각할 수 있었다.

이와 같이 내향전류의 최대치는 400 ms 후엔 거의 회복되어 기준자극에서의 값과 비슷해지지만 최대치에 이르는 시간과 최대치후 감소하는 시간 경과에 control과 비교하여 큰 차이가 있어 빠른 감소를 보였다. 따라서 느리게 감소하는 성분의 회복은 훨씬 느린 경과로 진행되는 것으로 보였으므로 다음엔 내

향전류의 최대치는 충분히 회복된 후, 자극간격이 내향전류의 시간경과에 미치는 영향을 실험하였다. 그림 3A에서 자극간격을 30초에서 20, 10, 5, 1초로 줄였을 때의 기록을 겹쳐서 보여주고 있다. 자극간격을 줄임에 따라 최대치에 이르는 시간이 빨라졌고, 최대치 후 감소하는 시간경과가 단계적으로 빨라짐을 알 수 있었다. 이를 좀더 확실히 보기 위하여 10초와 1초 간격의 자극에서의 결과를 semilog plot하여 비교하여 보았다(Fig. 3B). 10초 간격의 자극에서 전류감소의 시정수가 24.2 ms이던 것이 1초 간격의 자극에서는 11.9 ms로 감소하였다.

3. prepulse에 의한 영향

본 실험에서의 같이 토끼 심방근에서 짧은 pulse 후에 나타나는 Na-Ca 교환전류는 근장그물에서의 Ca의 유리에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다 (Earm 등, 1990). 그렇다면 test pulse를 주기 전에 여러가지의 prepulse를 주어 Ca 유입량을 변화시킨다면 근장그물의 Ca 저장량이 변화할 것이고, 따라서 Na-Ca 교환전류에 영향을 줄 것이다. 이와 같은 가정을 실험하기 위한 pulse protocol을 Fig. 4A의 오른쪽 위에 표시하였다. 30초 간격의 기준자극을 주며 기록하다가(C로 표시) 2개의 prepulse를 2초 간격으로 준 후 test pulse에 의해 활성화되는 내향전류를 기록해 보았다. prepulse의 기간이 test pulse와 같이 2 ms로 짧은 경우에는 내향전류의 최대치는 오히려 감소하였으나 200 ms의 긴 prepulse를 준 경우에는 그 크기가 증가하였다(Fig. 4B). 전류감소의 시간경과는 prepulse의 기간과는 관계가 없이 prepulse를 준 경우 모두 빨라졌고, 이는 Fig. 3의 실험에서 본 것과 같이 자극간격이 짧아진 효과로 설명할 수 있겠다. 그림으로 보이지는 않았지만 prepulse의 횟수 및 크기 변화도 교환전류의 최대치에 영향을 주었다. 긴 prepulse의 경우 횟수가 많을수록 더욱 증가하였고, prepulse의 크기가 30 mV 이하에서는 전류증가를 볼 수 없었다. 따라서 교환전류가 세포 내 Ca에 의해 활성화되는 것임을 생각할 때 prepulse에 의해 유입된 Ca이 근장그물에 저장되었다가 그 다음의 pulse에 의해 활성화되는 교환전류의 크기에 영향을 주는 것으로 해석할 수 있겠다. Fig. 4A에서는 이와 동일한 효과를 활동전압의 변화에서도 볼

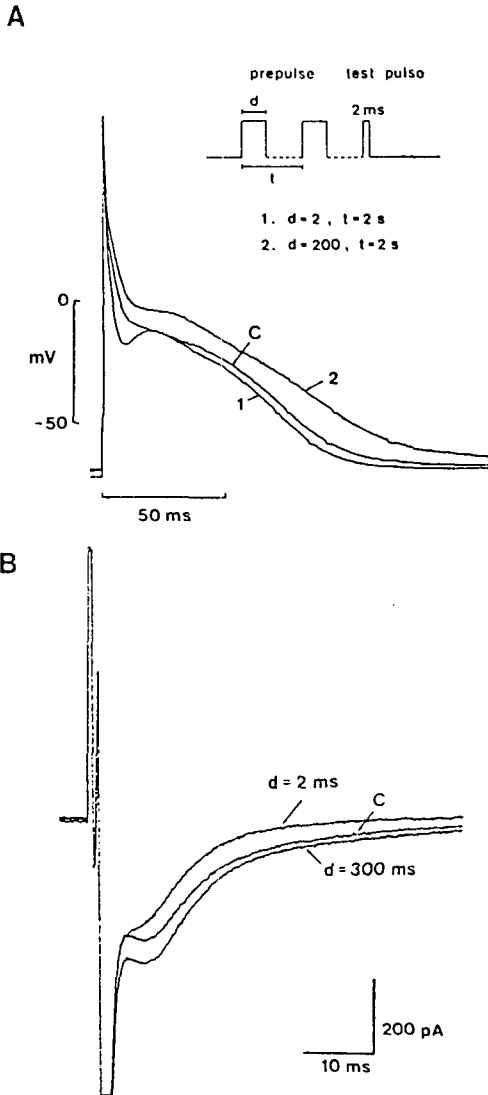


Fig. 4. Potentiation of the inward current and action potential plateau by long prepulse. Inset shows pulse protocol. Relative to the control current without prepulse, the current after the prepulse stimulation was relaxed faster. The peak current was potentiated when the prepulse duration was 200 ms long(B). The effect of prepulse on the late plateau (A) was very similar to that on the inward current shown in B.

수 있음을 나타낸다. A와 B는 같은 세포에서의 기록은 아니나 긴 prepulse에 의해 활동전압의 late plateau가 높아지는 효과는 B에서의 교환전류의 내

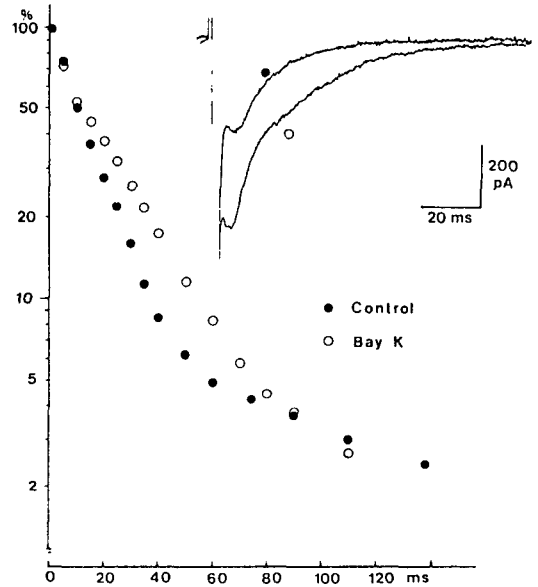


Fig. 5. The effect of Bay K on the inward current. The superimposed current recordings before (filled circle) and after the $1 \mu\text{M}$ Bay K (open circle) are shown in the right upper corner. Bay K increased the inward current. The semilog plot of current relaxation shows that timecourse was prolonged by Bay K.

향성분이 커지는 변화와 잘 일치한다.

4. Bay K에 의한 영향

Earm 등 (1990)의 결과에 의하면 Ca-전류의 전류-전압 관계와 Na-Ca 전류의 전류-전압관계는 차이를 보여 근장그물에서 유리되는 Ca에 의한 세포내 Ca transient가 유입되는 Ca량과 직접 비례하는 것은 아님을 시사한다. 그러나 근장그물의 Ca 저장량은 유입되는 Ca량이 증가하면 커질 것이므로 Ca-전류를 증가시키면 영향을 받을 것으로 생각되어 Bay K를 주었을 때의 효과를 실험하여 보았다. Fig. 5에서 보이는 바와 같이 $1 \mu\text{M}$ Bay K에 의하여 내향전류의 최대치가 현저히 증가하였으며 전류감소의 시간경과는 도리어 다소 느려짐을 알 수 있었다.

5. c-AMP 및 isoprenaline에 의한 영향

β -수용체는 여러 기전을 통하여 심장의 기능을

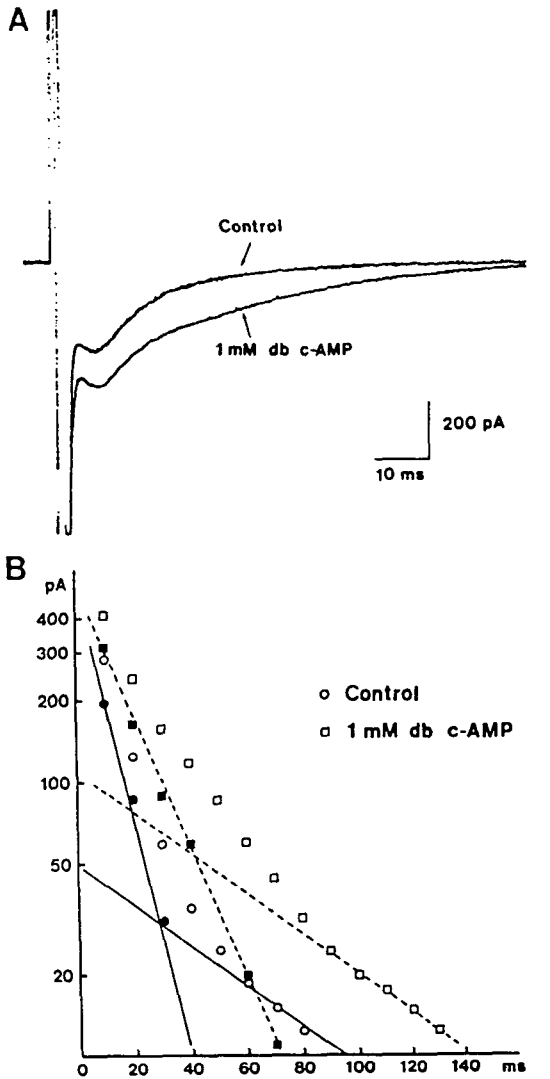


Fig. 6. The effect of 1 mM dibutyryl c-AMP on the inward current. A) The current recordings were superimposed before (control) and after 1 mM dibutyryl c-AMP. Cyclic AMP increased the inward current. B) The timecourses of the current relaxation were plotted in semilog scale. Open symbols were total measured current, which were fitted by two components: fast and late slow. Filled symbols were differences between the values of open symbols and those of extrapolated slow components and showed fast components. The timecourse was prolonged by c-AMP.

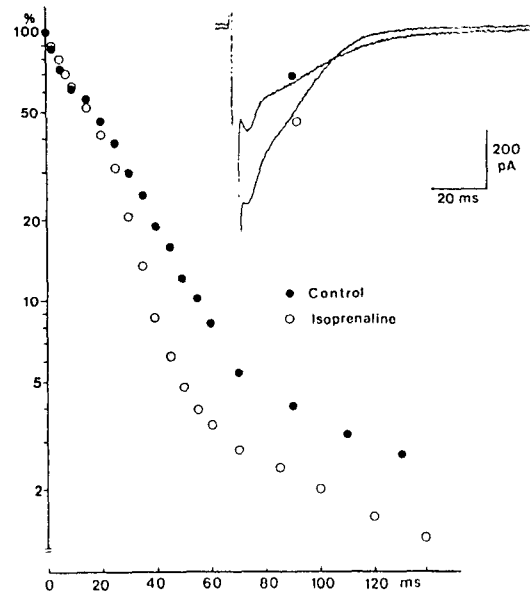


Fig. 7. The effect of 1 μ M isoprenaline on the inward current. The current recordings were superimposed before (filled circle) and after 1 μ M isoprenaline (open circle). The current relaxations are plotted with the same symbol and showed faster relaxation by isoprenaline.

촉진하는데 그 중에서도 Ca-전류에 대한 효과는 수축력 증가(positive inotropy) 및 박동수의 증가(positive chronotropy)를 동시에 설명할 수 있어 가장 중심적인 활동기전으로 생각되고 있다. β -수용체가 Ca-전류를 증가시키는 작용은 c-AMP를 통하여 나타나는 것으로 알려져 있고, 단일세포에 직접 c-AMP를 주입한 실험들(Trautwein and Kameyama, 1987)을 통해 증명되었다. 그러나 β 수용체의 작용이 모두 c-AMP를 통한 것이라고 단정 지을 수는 없다. 따라서 앞의 실험에서와 같이 Bay K로 Ca-전류만을 직접 증가시켰을 때와 c-AMP 투여 및 β -agonist인 isoprenaline 투여에 의한 Na-Ca 교환전류의 변화를 비교함은 이들의 상관관계를 추정하는데 중요하리라 생각된다. Fig. 6A에서는 c-AMP에 의한 Na-Ca 교환전류의 변화를 동일세포에서 비교하기 위하여 세포막을 통과할 수 있는 dibutyryl cAMP를 1 mM 첨가하여 보았는데, 최대 전류치가 증가하였고 최대치에 이르는 시간은 8 ms

에서 9 ms로 느려졌으며 전류감소의, 시간경과도 느려졌다. Fig. 6B에서 A의 결과를 plot하였는데 전류감소를 빠른 성분과 느린 성분으로 나누었을 때, 빠른 성분의 시정수는 10 ms에서 18 ms로 느려졌으며 느린 성분의 시정수는 60 ms에서 58 ms로 거의 변화가 없었다. 따라서 c-AMP의 효과는 Bay K로 Ca-전류를 증가시킨 효과와 거의 유사한 것으로 생각되었다. Fig 7에서는 1 μ M isoprenaline에 의한 내향전류의 변화를 보았다. 변화의 양상을 요약하면 내향전류의 최대치가 증가하였고, 최대치에 이르는 시간은 다소 빨라졌으며, 전류감소의 시간경과 또한 빨라져서 c-AMP의 작용과는 차이가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

Earm 등(1990)의 방법으로 기록한 내향전류는 그 여러가지 특성—EGTA의 영향, ryanodine의 효과, 세포내 Ca 및 Na 농도 경사에 대한 의존성, 전류-전압 관계 등—으로 보아 세포내 Ca transient에 의해 활성화 된 Na-Ca 교환전류로 생각되었다. 본 연구에서는 실제 수축력의 변화를 가져 올 수 있는 여러조건들이 내향전류에도 예측한대로의 영향을 미침을 확인함으로써 이 내향전류가 세포내 Ca 농도 변화를 잘 반영할 수 있음을 보여주었다. 그리고 더 나아가 내향전류의 kinetics를 분석하고 각 조건에서 어떠한 변화를 보이는가를 비교분석함으로써 세포내 Ca 농도를 조절하는 여러 기전들과의 관계를 규명해 보고자 하였다.

세포내 Ca 농도 증가에 의해 나타나는 내향전류는 Mitchell 등(1987a; 1987b)이 쥐와 guinea-pig의 심실근에서, Fedida 등(1987)이 guinea-pig 심실근에서, Giles & Shimoni(1989)가 토끼 심실근과 심방근에서 Ca-전류를 활성화시키는 저분극 pulse를 준 후 나타나는 slow tail current로도 보고된 바 있다. 그러나 기록된 전류의 양상은 큰 차이를 보여 이들의 실험에서는 전류가 느리게 감소하는 tail로 나타나는데 반해서 (half time of decay: 150 ms) 본 실험에서의 기록은 6~12 ms 후에 최고치에 도달하는 활성화과정과 그에 이어 자발적으로 감소하는 일과성인 양상으로 나타나고 그 시간경과도 빨랐다.

내향전류의 최대치도 다른 연구자들의 기록과 많은 차이를 나타낸다. Fedida 등(1987)은 guinea-pig 심실근에서 Ca-전류의 최대치의 10~20% 내외라고 하였고, Campbell 등(1988)은 개구리 심방근에서 20 pA였으며, Giles & Shimoni(1989)는 토끼 심실근에서 40~60 pA, 심방근에서 30~50 pA였던 데 비해 본 연구에서 기록된 250~400 pA의 크기는 매우 큰 것이다.

이러한 차이를 설명할 수 있는 몇가지 가능성을 제시한다면, 첫째는 pulse protocol의 차이이다. 토끼 심방근에서도 10 ms 이상의 긴 pulse를 주는 경우에는 활성화 과정(activation)은 볼 수 없고 tail로만 나타났으나(Earm et al, 1990), 2~5 ms 자극에서 최대활성을 얻을 수 있었으므로 본 실험에서는 2~5 ms의 짧은 기간의 자극을 주었다. 본 실험에서는 -70 mV에서 내향전류를 기록했으나 다른 연구자들은 -40 mV에서 기록한 것도 전류의 크기 및 시간경과에 영향을 줄 수 있었으리라 생각된다. 둘째로는 EGTA의 영향이다. 본 연구에서는 전극내 용액에 10 μ M에서 0.1 mM의 EGTA를 사용하였고, 따로 분석하지는 않았지만 EGTA 농도의 증가는 내향전류의 시간경과를 빠르게 함을 알 수 있었다. Giles & Shimoni(1989)는 전극내 EGTA를 첨가하지 않았으므로 이 또한 시간경과가 느리게 된 원인이 되었을 것이다. Whole cell voltage clamp의 실험에서 가장 정상적인 세포내 환경을 유지시켜 줄 수 있는 EGTA 농도가 얼마인지는 알 수 없지만 10 μ M에서는 자발적인 내향전류의 활성화를 자주 볼 수 있었으므로 세포내 Ca overload가 된 것으로 보였고, 0.1 mM에서 정상적인 활동전압을 보였던 점(Earm et al, 1990)으로 보아 40 μ M에서 0.1 mM의 농도를 주로 사용했다. 이 농도 범위에서 실험할 때 조건 변화에 따른 반응 양상에는 별 차이를 보이지 않았다. 셋째로는 종(species)과 조직에 따른 차이로 이는 ryanodine에 의한 영향의 차이에서 그 근거를 찾을 수 있을 것으로 생각된다. Guinea-pig에서의 tail current는 ryanodine에 의해 거의 영향을 받지 않는 반면 쥐의 심실근에서는 거의 완전히 억제되는데(Mitchell et al, 1987b), 이는 쥐의 심실근의 경우 세포내 Ca transient를 이루는데 있어서 그만큼 근장그물의 기능이 우선적으로 작용하기 때문으

로 해석할 수 있다. 이러한 관점에서 토끼의 심방근은 쥐의 심실근과 그 성질이 유사하리라 생각되므로, 토끼의 심방근에서 내향전류의 시간 경과와 근장그물에서의 Ca 유리 및 재흡수로 인한 세포내 Ca 농도의 변화를 반영한다고 볼 수 있고 근장그물의 기능에 의해 종에 따라 시간경과의 차이가 나타날 수 있는 것으로 생각된다. 그러나 Giles & Shimoni (1989)의 실험에서는 같은 토끼 심방근을 사용했음에도 불구하고 본 실험의 결과와 많은 차이를 보였는데 이는 실험 온도(23°C), 유지전압(-40 mV) 등의 조건이 내향전류를 최대로 활성화 시킬 수 있는 조건이 아니었기 때문으로 생각된다. 또한 그들의 실험 결과중 내향전류가 ryanodine에 의해 억제되지 않은 것은 본 실험의 결과와 상반될 뿐만 아니라, 활동전압의 후반부 plateau 및 그 시기의 Ca 유출이 ryanodine에 의해 억제된다는 증거(Hilgemann, 1986)와도 맞지 않아 그들의 결과가 실제 세포내 Ca 농도 변화와 관련있는 전류인지에 문제점이 있다고 생각된다.

자극의 빈도와 수축의 변화(positive staircase 및 negative staircase 현상)와의 관계를 규명하기 위하여 많은 실험들(Woodworth, 1902, Rosin and Farah, 1955; Chapman and Niedgerke, 1970; Wohlfart, 1979; Boyett and Fedida, 1984)이 행해졌고, 활동전압의 변화와의 상관관계를 찾음으로서 그 기전을 규명해 보고자 하였으나 조직에 따라 그 현상 자체도 차이가 많았고 명확한 답을 얻을 수 없었다. Fedida 등(1987)은 paired pulse를 여러 다른 간격으로 주며 Ca-전류와 slow tail과 수축을 동시에 기록한 실험에서 수축의 회복과 slow tail의 회복과정이 잘 맞는 것을 보여 slow tail이 세포내 Ca transient를 잘 반영함을 밝혔다. 그에 반해 Ca-전류의 회복경과는 수축의 회복경과는 차이가 있었으므로 수축의 크기가 Ca-전류의 크기에 비례하여 결정되는 것은 아니며 또한 자극간격에 따른 Ca-전류의 변화가 수축크기 변화의 직접원인은 아니라고 생각하였다. 자극간격에 따른 수축크기의 변화의 기전을 밝히기 위하여 Hilgemann(1986)은 세포의 Ca transient를 측정하여 수축과정에서 세포내로 이동하는 Ca 량과, 세포 밖으로의 배출량, 그 차이로 추정되는 세포내 저장량을 계산하였다. 그 결과 짧은

간격의 premature beat에서는 근장그물이 비활성화(inactivation)로부터 회복이 안 된 상태에 있어 더 이상의 Ca을 유리하지 못함으로써 수축이 감소하며, 휴식후수축의 negative staircase는 Ca 배출량이 유입량보다 많아 세포내저장량이 감소하여 일어나는 것으로 설명하였다. 본 실험에서는 paired pulse를 주며 내향전류의 회복과정(recovery)을 관찰하였는데, 전류의 최대치의 회복과 시간경과의 회복양상이 서로 다른 것으로 나타났다. 이는 이 두과정이 서로 다른 기전에 의해 이루어지며 자극 간격 변화에 따른 반응 또한 서로 다를 것을 뜻한다고 생각된다. 초기의 활성화로 나타나는 성분은 비교적 빨리 회복되며 Ca 전류와 밀접한 관계를 가지나 이는 충분한 기간 동안 지속되는 세포내 Ca 농도의 증가를 가져오지는 못하는 것으로 보인다. 이에 반해 내향전류의 느린 감소로 나타나는 세포내 Ca 농도의 지속적 증가는 충분한 휴식 후에 더욱 강화되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 토끼 심방근의 수축 실험에서 볼 수 있는 휴식후강화(post-rest potentiation) 현상과 잘 일치하는 것이다. 따라서 오래 지속되는 내향전류 성분은 근장그물의 기능을 반영하는 지표가 될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 점을 고려하여 본 실험에서는 내향전류의 느린 성분이 일정하게 잘 나타나도록 30초 간격으로 자극을 주며 실험하였고 대부분 30분 내외의 실험기간 중 일정한 크기의 내향전류를 기록할 수 있었으므로 이런 실험조건이 근장그물의 Ca 저장량을 depletion시키지는 않음을 알 수 있었다. 내향전류에 의해 배출되는 Ca 양을 자극시 Ca 전류에 의해 유입되는 Ca양과 비교한다면 배출량이 더 많은 것으로 보이는 점을 고려할 때, 그정도의 차이가 세포내의 Ca 저장량 자체에 큰 영향을 미치지 않거나 아니면 휴식기간 중의 Ca 이동이 그 차이를 보상할 수 있는 방향으로 일어나는 것으로 생각된다.

Earm 등(1990)의 실험에서 보인 pulse의 크기와 일과성 내향전류와의 관계를 보면 Ca-전류의 전류-전압관계와는 큰 차이를 나타낸다. 따라서 세포내 Ca transient의 크기는 저분극 pulse시 유입된 Ca량과 직접적 관계는 없으며, 유입되는 Ca은 Ca 유리를 유발시키는 역할만을 하는 것으로 생각하였다. Cannell 등(1987)은 쥐의 심실근에서 Ca-sensitive

dye로 calcium transient를 측정하며 막전압과의 관계를 본 실험에서 Earm 등(1990)의 결과와 유사한 전류-전압관계를 제시하였고, Ca 유리가 유입된 Ca에 의해 유발되는 기전 외에 직접 전압에 의해 영향을 받을 가능성이 있다고 해석하였다. Fig. 4의 결과는 prepulse의 길이가 그 다음 자극에 의한 내향전류의 크기에 영향을 주는 것을 나타내는데 이 또한 Ca 저장량이 Ca transient의 크기를 결정함을 반영하는 것으로 생각할 수 있다. 이는 Isenberg 등(1987)이 prepulse의 길이와 수축의 크기와의 관계를 실험한 결과와도 잘 일치하며 Fabiato(1985)가 simulation으로 제시한 Ca-전류의 초기의 빠른 부분은 근장그물의 Ca 유리를 유발하며 내향전류의 느린 부분은 근장그물을 load시켜 그 다음의 수축에 이용된다는 주장을 뒷받침하고 있다.

Ca 유입의 증가가 Ca transient를 크게 할 수 있음을 Bay K, c-AMP 및 isoprenaline에 의해 내향전류의 최대치가 증가하는 결과에서도 볼 수 있다. Bay K에서와 같이 단순히 Ca transient만 증가될 때는 감소하는 시간 경과와는 다소 느려지는 것으로 나타나는데 Hodgkin 등(1987)이 Salamander rod cell에서 관찰한 Ca load와 교환전류의 시간 경과와의 관계도 이와 유사하다. 이와 반대로 isoprenaline은 내향전류 감소의 시간경과를 빠르게 하였다(Fig. 7). Isoprenaline의 이러한 효과는 Fedida 등(1987)이 guinea-pig 심실근에서도 기록하였고, adrenaline이 세포내 Ca을 빨리 격리(sequestration)하여 (Fabiato and Fabiato, 1975) 수축의 속도를 빠르게 한다는 실험적 근거들이 많다(Nathan, 1975). 그러나 isoprenaline의 이러한 작용은 c-AMP를 통하여 근장그물막(SR membrane)의 phospholamban을 phosphorylation시켜 일어나리라고 생각되고 있는데(Hayes, 1986; Lindemann et al, 1983), 본 실험에서 isoprenaline의 효과와 c-AMP의 효과가 다르게 나타남은 의외의 결과로 아직 규명되어야 할 것이 많음을 시사한다.

결 론

토끼 심방근 활동전압의 late plateau는 Na-Ca 교환기전에 의한 Ca 이동에 의하여 이루어지는 것

로 생각되고 있다. 토끼의 단일 심방근 세포에서 whole cell voltage clamp 방법으로 +40 mV, 2 ms의 pulse후 -70 mV에서 활성화되는 Na-Ca 교환기전에 의한 내향전류를 기록하고 그 특성을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 30초 간격으로 자극할 때 내향전류는 pulse 시작 후 6~12 ms 후에 최고값에 도달했으며, 평균크기는 342 pA였다.

2) 최고값에 이른 후 내향전류는 점차 감소하였는데 감소의 시간경과는 빠른 부분과 느린 부분의 두 부분으로 나눌 수 있었다.

3) 여러 간격의 paired pulse를 30초 간격으로 주며 내향전류의 회복을 관찰하였다. 내향전류의 최대치는 자극간격이 넓어짐에 따라 지수함수적으로 회복되었고, 회복되는 시간경과는 Ca 전류가 회복되는 경과와 유사하였다.

4) 내향전류가 감소하는 시간 경과와는 자극 간격에 의해 크게 영향을 받았는데, 자극 간격이 30초에서 1초 사이로 짧아질수록 그 시정수가 거의 직선적으로 감소하였다.

5) 내향전류의 최대치는 200 ms의 긴 prepulse를 주거나, Bay K나 isoprenaline 투여 및 c-AMP 투여에 의하여 증가하였다.

6) 내향전류의 감소의 시간경과는 Bay K, c-AMP에 의해 느려졌으며 isoprenaline에 의하여 빨라졌다.

이상의 실험 결과로부터 Bay K, c-AMP, isoprenaline에 의한 Ca-전류 증가나, 긴 prepulse는 근장그물의 Ca 저장량을 증가시켜 Ca transient를 크게 하며, isoprenaline은 근장그물의 Ca 유리와 Ca 흡수를 동시에 촉진하여 Ca transient를 빠르게 하는 것으로 결론지을 수 있었다.

REFERENCES

- Boyett MR & Fedida D (1984). Change in the electrical activity of dog cardiac Purkinje fibers at high heart rates. *J Physiol* 350, 361-391
- Campbell DL, Giles WR, Robinson K & Shibata EF (1988). Studies of the sodium-calcium exchanger in bull-frog atrial myocytes. *J Physiol* 403, 317-340
- 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
- Caroni P & Carafoli E (1981). The Ca-pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 256, 3263-3270
- Champan RA & Niedergerke R (1970). Interaction between heart rate and calcium concentration in the control of contractile strength of the frog heart. *J Physiol* 211, 423-443
- Earm YE, Ho WK & So IS (1990). Inward current generated by Na-Ca exchange during the action potential in single atrial cells of the rabbit. *Proc R Soc Lond* 240, 61-81
- Fabiato A (1985). Stimulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 291-320
- Fabiato A & Fabiato F (1975). Relaxing and inotropic effect of cyclic AMP on skinned cardiac cells. *Nature* 253, 556
- Fedida D, Noble D, Shimoni Y & Spindler AJ (1987). Inward current related to contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 385, 565-589
- Giles W & Shimoni Y (1989). Slow inward currents in rabbit cardiac cells. *J Physiol* 417, 447-463
- 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. *Pflüger Archiv* 395, 6-18
- Hayes JS (1986). Coordination of cardiac contractility and metabolism by protein phosphorylation. In: Solaro RJ (ed) *Protein phosphorylation in heart muscle*. CRC Press, pp 17-54
- 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 (1987). Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transients in rabbit atrium: Reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc Royal Soc B* 230, 163-205
- Hodgkin AL, Macnaughton PA & Nunn BS (1987). Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rod. *J Physiol* 391, 347-370
- Hume JR & Uehara A (1986). Properties of 'creep currents' in the single frog atrial cells. *J Gen Physiol* 87, 833-857
- Hume JR & Uehara A (1986). 'Creep currents' in single frog atrial cells may be generated by electrogenic Na-Ca exchange. *J Gen Physiol* 87, 857-885
- Isenberg D, Klockner U, Mascher D & Ravens U (1987). Changes in contractility and membrane currents as studied with a single patch-electrode whole cell clamp technique with a single cardiac cells. In: Noble D & Powell T (ed) *Electrophysiology of Single Cardiac Cells*. Academic Press, p 25-58
- 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
- Kimura J, Noma A & Irisawa H (1986). Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 319, 596-597
- Langer GA (1982). Sodium-calcium exchange in the heart. *Ann Rev Physiol* 44, 435-449
- Lindemann JR, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG & Watanabe AM (1983). β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca-ATPase activity in guinea-pig ventricle. *J Biol Chem* 258, 464-471
- Luttgau H & Niedergerke R (1958). The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J Physiol* 143, 486-505
- 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 (1984a). 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. *Br J Pharmacol* 81, 543-550
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1984b). Strontium, nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *Br J Pharmacol* 81, 551-556
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1987a). Electrical activity and contraction in cells isolated from rat and guinea-pig ventricular muscle: a comparative study. *J Physiol* 391, 527-544
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1987b). Calcium-activated inward current and contraction in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*

- 391, 545-560
- Mullins LJ (1981). *Ion Transport in Heart*. Raven Press, New York
- Nathan D & Beeler GW (1975). Electrophysiological correlates of the inotropic effects of isoprenaline in canine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 7, 1-
- Philipson KD (1985). Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicle. *Ann Rev Physiol* 47, 561-571
- Reuter M & Seitz N (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195, 451-470
- Rosin H & Farah A (1955). Post-stimulation potentiation of contractility in the isolated auricle of rabbit. *Am J Physiol* 180, 75-82
- Trautwein W & Kameyama M (1987). Post-stimulation potentiation of contractility in the isolated auricle of rabbit. *Am J Physiol* 180, 75-82
- Trautwein W & Kameyama M (1987). The mechanism of β -adrenergic regulation of calcium channels: intracellular injections and patch-clamp studies. In: Noble D & Powell T (ed) *Electrophysiology of Single Cardiac Cells*. Academic Press, p 105-123
- Wohlfart B (1979). Relationships between peak force, action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. *Acta Physiol Scand* 106, 395-409
- Woodworth RS (1902). Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause of the heart. *Am J Physiol* 8, 213-249