

## 동방결절에서 과분극에 의해 활성화되는 내향전류에 대한 Cyclic-GMP의 영향

유 신 · 호 원 경 · 엄 용 의

서울대학교 의과대학 생리학교실

**Effects of Cyclic-GMP on Hyperpolarization-activated inward Current ( $I_f$ ) in Sino-atrial Node Cells of Rabbit.** Shin Yoo, Won-Kyung Ho, and Yung E Earm Department of Physiology, Seoul National University College of Medicine, 28 Yonkeun-dong, Chongno-ku, Seoul 110-799, Korea

The aim of present study is to investigate the effects of cGMP on hyperpolarization activated inward current ( $I_f$ ), pacemaker current of the heart, in rabbit sino-atrial node cells using the whole-cell patch clamp technique. When sodium nitroprusside (SNP,  $80 \mu\text{M}$ ), which is known to activate guanylyl cyclase, was added,  $I_f$  amplitude was increased and its activation was accelerated. However, when  $I_f$  was prestimulated by isopreterenol (ISO,  $1 \mu\text{M}$ ), SNP reversed the effect of ISO. In the absence of ISO, SNP shifted activation curve rightward. On the contrary in the presence of ISO, SNP shifted activation curve in opposite direction. 8Br-cGMP ( $100 \mu\text{M}$ ), more potent PKG activator and worse PDE activator than cGMP, also increased basal  $I_f$  but did not reverse stimulatory effect of ISO. It was probable that PKG activation seemed to be involved in SNP-induced basal  $I_f$  increase. The fact that SNP inhibited ISO-stimulated  $I_f$  suggested cGMP antagonize cAMP action via the activation of PDE. This possibility was supported by experiment using 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), non-specific PDE inhibitor. SNP did not affect  $I_f$  when  $I_f$  was stimulated by  $20 \mu\text{M}$  IBMX. Therefore, cGMP reversed the stimulatory effect of cAMP via cAMP breakdown by activating cGMP-stimulated PDE. These results suggest that PKG and PDE are involved in the modulation of  $I_f$  by cGMP: PKG may facilitate  $I_f$  and cGMP-stimulated PDE can counteract the stimulatory action of cAMP.

Key Words: Sino-atrial node, Hyperpolarization-activated inward current( $I_f$ ), cGMP, cAMP, IBMX

### 서 론

cAMP나 cGMP와 같은 cyclic nucleotide는 잘 알려진 세포내 이차 전령이며 이온 통로들은 그러한 이차 전령들의 주요 표적 중의 하나이다. cAMP는 심장 박동을 빠르게하고 심박출량을 증가시키는 교감신경 흥분의 신호 전달에 관여한다. 교감신경 흥분으로 분비되는 noradrenaline이  $\beta$ -adrenergic 수용체에 결합하면 이 수용체와 연결되어 있는 G 단백을 거쳐 효과가 나타나는데, 두 가지의 서로 다른 경로가 있다(Brown, 1990). 하나는 membrane-delimited pathway라고 불리는 경로로서, 이차 전령

이 관여하지 않고  $G_s$  protein과 특정 이온 통로와의 직접적인 상호작용으로 이온 통로의 활성이 조절된다(Clapham, 1994). 다른 하나는 이차 전령을 경유하는 경로로써  $G_s$  protein이 adenylate cyclase를 활성화시켜서 세포내 cAMP를 증가시키고 이에 따라 cAMP-dependent protein kinase가 활성화되어 여러 이온 통로들이 인산화되고 인산화에 의하여 이온 통로의 활성이 조절된다. 심근 칼슘 전류가 cAMP-의존성 인산화로 조절되고 있음은 대표적인 예이다(Hartzell, 1988).

cGMP는 acetylcholine, atrial natriuretic peptides와 같은 홀몬과 신경전달물질의 작용에 관여함이 보고되고 있으며 심장에서 cAMP와 길항적으로 작용한다고 알려져 왔다(Balligand et al, 1993; Anand-Srivastava & Trachte, 1993). 그러나, cGMP가 심근세포의 여러 이온 전류에 미치는

효과는 같은 칼슘 전류에 대해서도 종과 조직에 따라 많은 차이를 보여서 세포내에서 작용이 다양할 가능성이 시사되었고, 각종 phosphodiesterase (이하 PDE)들과 cGMP dependent protein kinase (이하 PKG) 등의 관련성이 보고되고 있다(Fischmeister & Hartzell, 1986; Levi et al, 1989; Han et al, 1993).

과분극에 의해 활성화되는 내향전류( $I_f$ )는 포유류와 양서류의 심장의 pacemaker 조직에서 일찍이 관찰되었으나 전류가 활성화되는 전압 범위와 pacemaking이 일어나는 전압 범위와의 차이 때문에 pacemaker activity에의 역할에 대해 논란이 있어왔다(Noma & Irisawa, 1976; Brown et al, 1977). 그러나 심장 박동과 심박출량을 조절하는 자율신경에 의해  $I_f$ 가 조절됨이 보고되면서 심박동수 조절에 있어서  $I_f$  역할의 중요성이 강조되고 있다(Brown et al, 1983).  $I_f$ 는 교감신경 흥분으로 활성화되고 부교감 신경 흥분으로 억제되는데, 최대로 활성화되었을 때의 전도도의 변화 없이  $I_f$  활성화곡선이 voltage축을 따라 이동된다고 보고되었고(DiFrancesco et al, 1986; 1989), 이러한 자율신경에 의한  $I_f$ 의 조절은 adenylate cyclase의 활성화와 그 결과 산물인 세포 내 cAMP를 통해 이루어짐이 알려졌다(DiFrancesco & Tromba, 1988). cAMP의  $I_f$  조절 기전은 L-type 칼슘 전류에서와는 달리 인산화와 무관하게 cAMP 그 자체 만으로 최대로 활성화되었을 때의 전도도를 변화시키지 않으면서 활성화곡선을 이동시키며 cGMP, cCMP같은 다른 cyclic-nucleotide도 cAMP보다 efficacy는 낮지만 같은 효과를 갖는다고 보고되었다(DiFrancesco & Tortota, 1991). 그러나  $I_f$ 에 대한 cGMP의 작용에 칼슘 전류의 경우와 같이 PDE나 PKG가 관여할 것인가는 아직 분명하게 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 토끼 동방결절 단일 세포를 대상으로 전기생리학적 연구방법을 이용하여 과분극에 의해 활성화되는 내향전류에 미치는 cGMP의 효과 양상을 cAMP를 증가시키지 않았을 때와 cAMP를 증가시켰을 때 각각에 대해 관찰하고 그 기전을 밝히고자 하였다.

## 방 법

### 세포 분리

토끼의 단일 동방결절 세포는 van Ginneken & Giles W (1991)의 방법에 약간의 수정을 가하여 분리하였다. 토끼는 암, 수 구분없이 1~2 kg 정도의 것을 사용하였으며, sodium pentobarbitone (50 mg/Kg) 으로 마취한 뒤 심장을 신속히 적출하여 Langendorff apparatus에 달고 37°C, 100% 산소로 포화시킨 정상 Tyrode 용액을 5분간 관류한

뒤  $Ca^{2+}$  제거 Tyrode 용액을 5분간 관류하였으며 이어서 효소가 들어 있는(20U ml<sup>-1</sup> collagenase, Yakult)  $Ca^{2+}$  free normal tyrode solution을 15분간 관류시켜서 세포간의 결합조직을 소화시켰다. 전체 심장에서 동방결절 부분(약 4×4 mm)을 잘라낸 뒤, 5조각으로 작게 잘라서 collagenase (382U ml<sup>-1</sup>, Wako), elastase (12.4U ml<sup>-1</sup>, Sigma Type II-A) 가 들어있는  $Ca^{2+}$  제거 Tyrode 용액에 넣고 30~40분 동안 37°C에서 소화시켰다. 소화된 조직을 modified KB solution으로 옮긴 뒤 끝이 무딘 유리피펫으로 1~2분 정도 조심스럽게 진탕하였다. 도립 현미경 시야에서 분리된 단일 동방결절 세포를 확인한 뒤 4°C에서 보관하였다.

### 실험 용액

정상 Tyrode 용액의 조성은 다음과 같았다(mM) : NaCl 143, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 0.5, glucose 5.5, HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 5.0. 시약을 모두 녹인 후 NaOH로 적정하여 pH 7.4로 맞추었다.  $Ca^{2+}$  제거 Tyrode 용액은 정상 Tyrode 용액에서 CaCl<sub>2</sub>만 넣지 않았다.

Modified KB solution의 조성은 다음과 같았다(mM) : KOH 70, L-glutamate 50, KCl 40, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20, MgCl<sub>2</sub> 3, glucose 10, HEPES 10, EGTA (ethylene glycol-bis(b-aminoethylester)-N, N, N', N'-tetraacetic acid) 0.5. 시약을 모두 녹인 후 KOH로 적정하여 pH 7.4로 맞추었다.

피펫내 용액의 조성은 다음과 같았다(mM): KCl 40, KOH 100, aspartate 100, HEPES 10, Mg-ATP 5, creatine phosphate disodium salt 2.5, creatine phosphate ditris salt 2.5, EGTA 5, MgCl<sub>2</sub> 1, GTP tris salt 0.1. 시약을 모두 녹인 후 KOH로 적정하여 pH 7.4로 맞추었다. 실험에 사용된 모든 시약들은 Sigma사(USA)에서 구입하였다.

### 전기 생리학적 기록

단일 동방결절 세포에 대한 막전압 고정법은 단일 세포 막전압 고정법(whole cell patch clamp)을 사용하였다(Hamill et al, 1981). 모든 실험은 항온 순환 장치(thermocirculator, Harvard Apparatus Inc.)를 사용하여 37°C에서 시행하였다. Patch clamp amplifier (Axopatch 1-C, Axon Instruments, USA)를 통해서 나온 신호는 digital oscilloscope (PM 3350, Phillips, Netherland)와 생리 기록기 (Recorder 220, Gould, USA)를 통해서 관찰하였다. 고정 전압과 자극전압을 가하고 이때의 전류 반응은 AD/DA converter (CED-1401, Science park, England)로 디지털 신호로 변환하여 digital tape recorder (DTR-1200, biologic, France)로 digital audio tape에 저장하였다가 EPC software

(CED electrophysiology package v. 6.0)와 386-급 개인용 컴퓨터를 이용하여 1kHz로 digitization하였다.

실험 protocol

사용한 유리 전극은 저항이  $3.98 \pm 0.86 \text{ M}\Omega$ 이었다. Series resistance 값은  $8.52 \pm 2.48 \text{ M}\Omega$  ( $n=17$ )이었고 이 값의 80%까지 compensation하였다. 단일 동방결절 세포의 cell capacitance는  $29.02 \pm 5.02 \text{ pF}$  ( $n=17$ )였다.

고정전압을  $-40 \text{ mV}$ 로 하고 10 mV간격으로 과분극 pulse를 가하여 기록한 tail current로 항정상상태 활성화곡선을 구하였다(결과 부분 참고, Fig. 1-C).

여러 agonist들에 대한  $I_f$ 의 반응을 보다 용이하게 관찰하기 위해서는 고정전압 ( $-40 \text{ mV}$ )에서 중간활성화전압 (mid activation potential)과 최대활성화전압 (full activation potential)인  $-80 \text{ mV}$ 와  $-120 \text{ mV}$ 로의 두 단계로 step

pulse를 20~30초 간격으로 계속해서 주면서 기록하였다.

실험 결과는 평균값±표준 오차(mean±SEM)으로 표기 하였으며, 필요한 경우에는 paired students *t*-test를 하여서 유의성을 검증하였다.

결 과

$I_f$ 의 전기 생리학적 기본 특성

고정전압을  $-40 \text{ mV}$ 로 하고 여러 단계의 과분극 pulse를 10 mV간격으로 가하여  $I_f$ 를 기록하였다 (Fig. 1-A).  $I_f$ 는  $-60 \text{ mV}$ 부터 활성화되며 일정 전압으로 pulse를 주고있는 동안 시간에 따라서 증가되는, 막전압과 시간에 의존적으로 활성화되는 전류(voltage & time dependent current)의 특성을 나타내었다. 각 voltage의 항정상상태 전

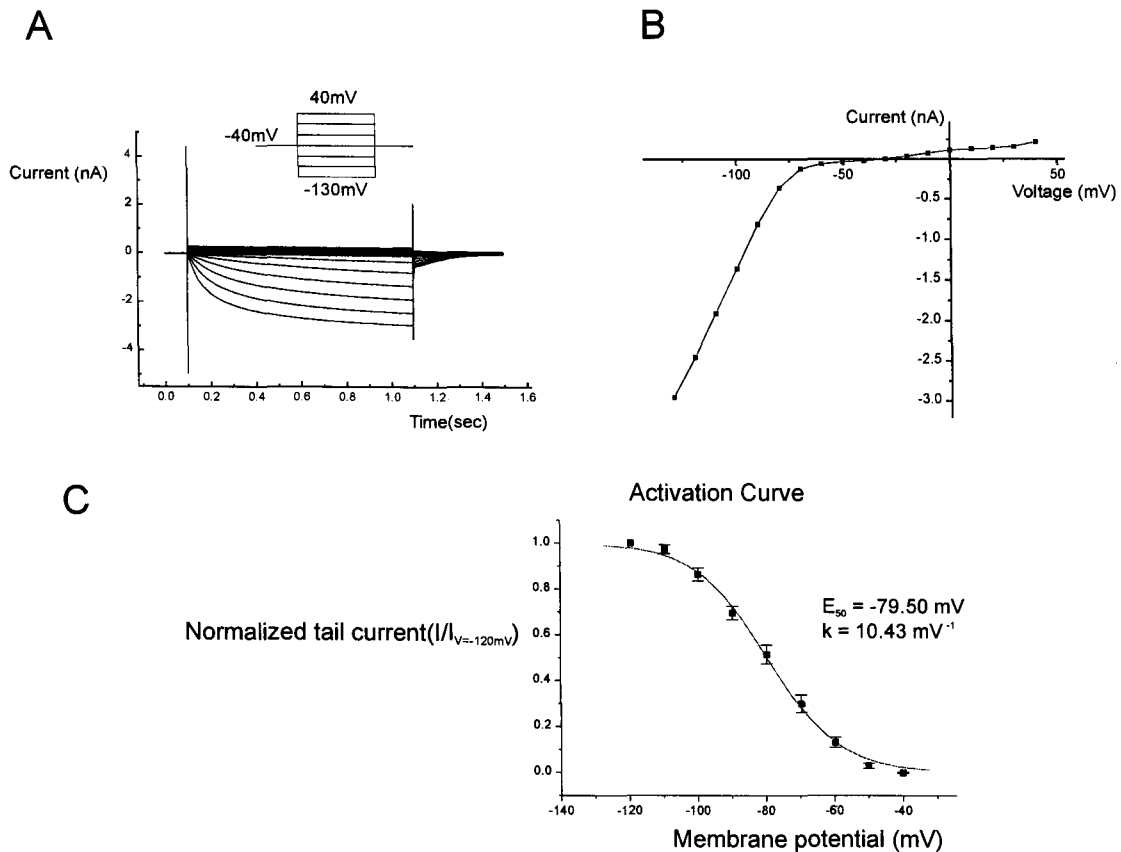


Fig. 1. Basic electrophysiological properties of hyperpolarization-activated inward current ( $I_f$ ). A. whole cell current evoked by 1s steps from  $-40 \text{ mV}$  to the range  $-120/+40 \text{ mV}$ , in 10 mV steps. B. Fully activated current-voltage (I-V) relationship of whole cell current. C. Steady state activation curve of  $I_f$ . Each point is the average±SEM of normalized tail current ( $I/I_{V=-120mV}$ ) measured from six cells. Activation curve was drawn according to eqn (1) in the text. Calculated mid-activation potential ( $E_{50}$ ) and slope factor ( $k$ ) were  $-79.50 \text{ mV}$  and  $10.43 \text{ mV}^{-1}$ , respectively.

류로 구한 전류-전압 관계( $I/V$  relationship)는 전형적인 inward rectification을 보이며 역전전압은 대략  $-30$  mV 이었다 (Fig. 1-B). 다양한 전압으로 test pulse를 주어 전류를 활성화시켰다가 다시 고정전압으로 되돌아 갈때 기록되는 tail current로 항정상태활성화곡선을 구하였다. 활성화곡선은 아래의 Boltzmann equation으로 fitting 하였다.

$$Y_{\infty} = \{1 + \exp((E_m - E_{50})/k)\}^{-1} \quad (1)$$

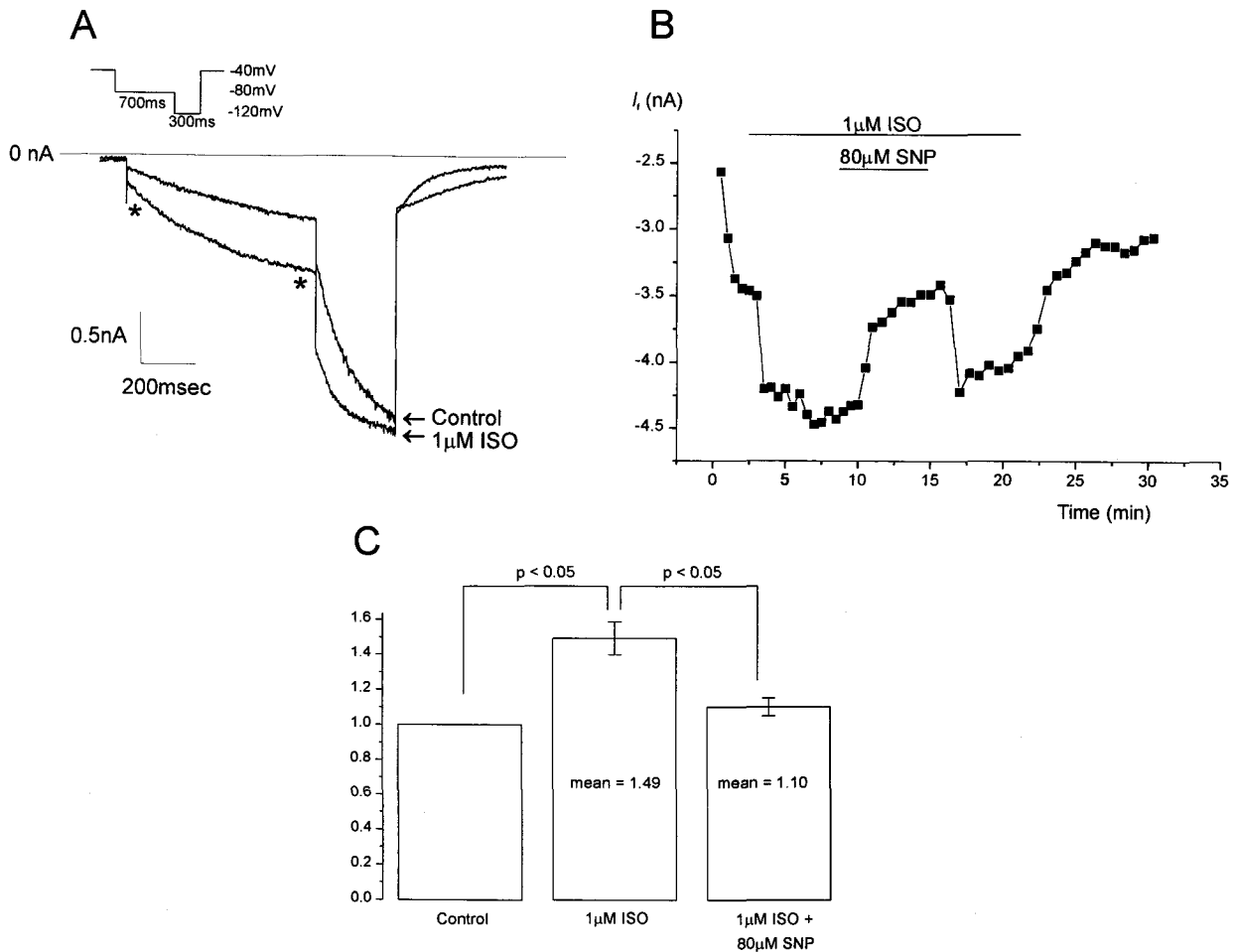
$Y_{\infty}$ 는 activation parameter,  $E_m$ 은 막전압(membrane potential),  $E_{50}$ 은 중간활성화전압 그리고  $k$ 는 slope factor이다.

계산된  $E_{50}$ 은  $-79.5$  mV였고 slope factor ( $k$ )는  $10.43$  mV $^{-1}$  였다 (Fig. 1-C).

#### SNP의 $I_f$ 에 대한 효과

본 연구에서는 세포내 cGMP를 증가시키기 위하여 대사 의존적 혹은 대사 비의존적 방식으로 nitric oxide를 유리하여 soluble guanylyl cyclase를 활성화시키는 sodium nitroprusside (이하 SNP)를 사용하였다(Feelisch, 1991; Ishibashi et al, 1993).

먼저 cAMP를 증가시켜서  $I_f$ 를 증가시킨 후 SNP의 효과를 보았다. Isopreterenol (이하 ISO,  $1 \mu\text{M}$ ) 전처리로



**Fig. 2.** Effect of SNP on ISO-stimulated  $I_f$ . A. From a holding potential of  $-40$  mV, the membrane was stepped close to  $I_f$  mid-activation potential ( $-80$  mV) and then to maximally activating potential ( $-120$  mV). The time-dependent current was increased and its activation was accelerated by  $1 \mu\text{M}$  ISO. The current increase at  $-120$  mV was much smaller than the increase at  $-80$  mV. B. Time course and reversibility of SNP effect on ISO-stimulated  $I_f$ .  $80 \mu\text{M}$  SNP reversed the effect of ISO. The time course of each drugs superfusion is marked by the bar. C. The change of  $I_f$  amplitude, measured between the start and end of hyperpolarizing pulse (asterisks in A), was normalized to the control. ISO significantly increased  $I_f$  compared with the control group. Addition of SNP significantly decreased  $I_f$  compared with the ISO group ( $n=4$ ).

$I_f$ 는 증가하였는데  $-120$  mV에서의 전류 증가가  $-80$  mV에서의 전류 증가보다 적었다 (Fig. 2-A). ISO로  $I_f$ 를 증가시킨 후 SNP ( $80 \mu\text{M}$ )를 가하면 증가된  $I_f$ 가 거의 control level까지 감소되는 것을 관찰하였다(Fig. 2-B).  $-40$  mV에서  $-80$  mV로의 step pulse를 700 msec동안 주고 있는 동안 시간에 따라 증가되는 전류의 크기를 비교하면, control을 1로 하였을 때 ISO를 처치하여  $1.49 \pm 0.09$ 로 증가하였고 SNP를 가하자  $1.10 \pm 0.05$ 로 감소하였다(Fig. 2-C).

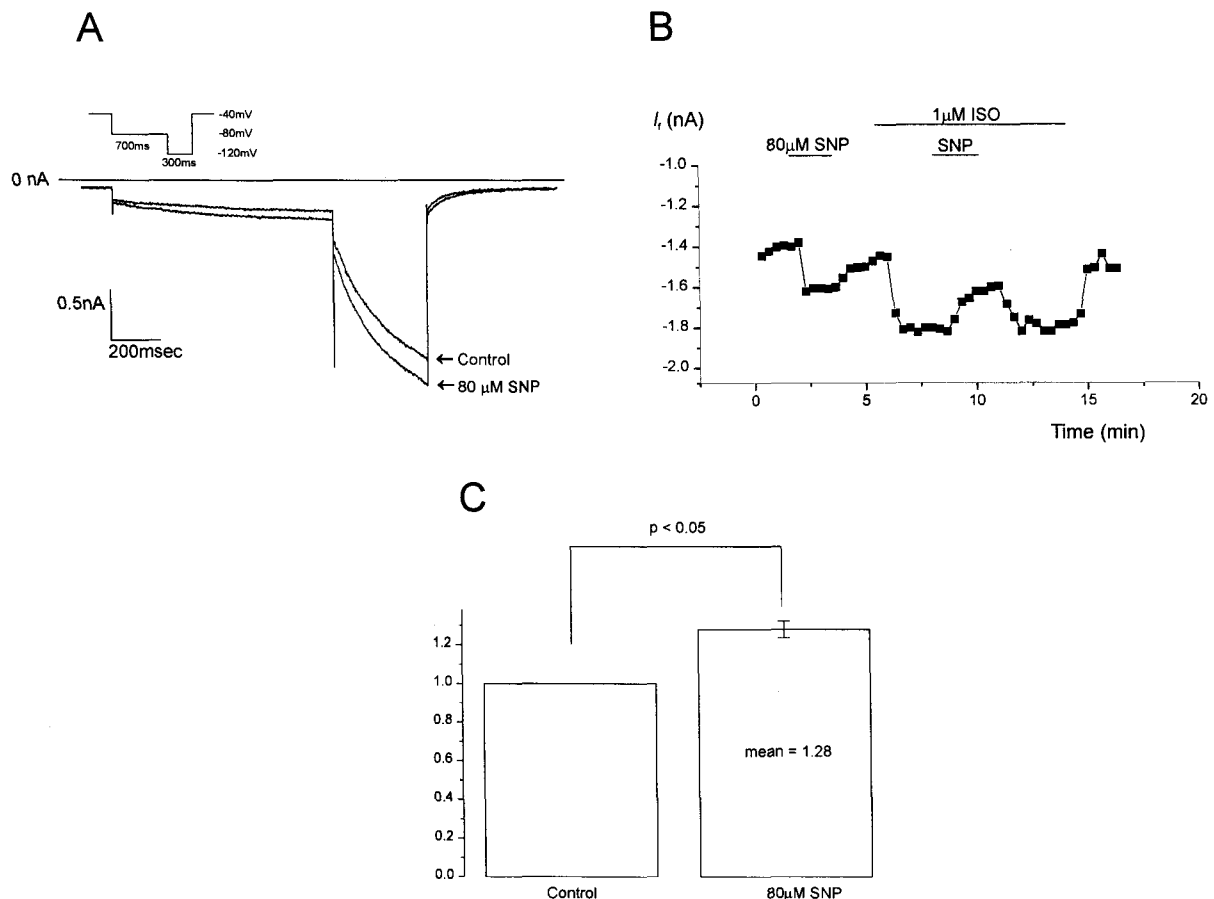
Basal  $I_f$ 에 SNP ( $80 \mu\text{M}$ )를 처치한 결과  $I_f$ 가 증가하였다 (Fig. 3-A, B). 마찬가지로  $-80$  mV로 pulse를 주고 있는 동안 시간에 따라 증가하는 전류의 크기를 비교하였다. 투여전과 비교할 때, SNP 처치에 의하여  $I_f$ 의 크기가  $1.28 \pm 0.04$ 로 증가하였다(Fig. 3-C).

이러한 SNP의 효과는 활성화곡선을 최대로 활성화되었을 때의 전도도의 변화 없이 활성화곡선을 voltage축을

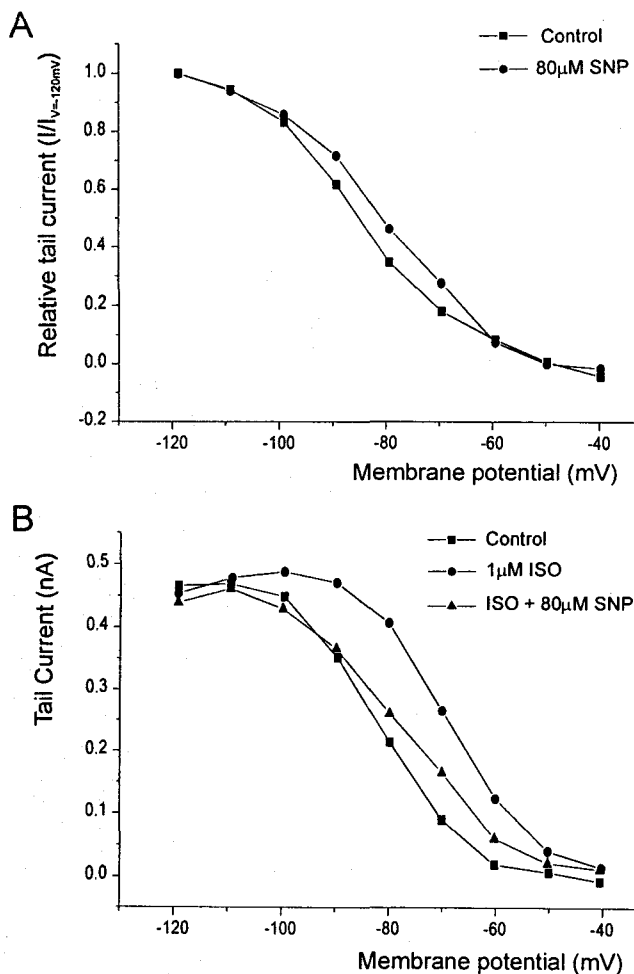
따라 이동시켰다(Fig. 4).

8Br-cGMP의  $I_f$ 에 대한 효과

cGMP 유사 물질중, PKG 활성화에 선택적 특성을 보이는 8Br-cGMP를 사용하여 PKG 활성화가  $I_f$  조절에 관여할 가능성을 알아보았다. 8Br-cGMP는 지질 친화성이 높아서 세포막을 통과할 수 있고 PKG를 활성화하는 능력은 cGMP보다 크고 PDE를 활성화하는 능력은 작은 유사 물질이다(Corbin JD et al, 1986). Basal  $I_f$ 에 8Br-cGMP ( $100 \mu\text{M}$ )를 가하면 전류가 증가되나(Fig. 5) ISO ( $1 \mu\text{M}$ )로 증가시킨  $I_f$ 에 가한 경우에는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 6). 이러한 결과는 cGMP에 의한 basal  $I_f$  증가에 PKG 활성화가 관여할 가능성이 있는 반면, ISO로 증가된  $I_f$ 를 감소시키는 기전은 PKG 이외의 다른 경로임을 유추할 수 있었다.



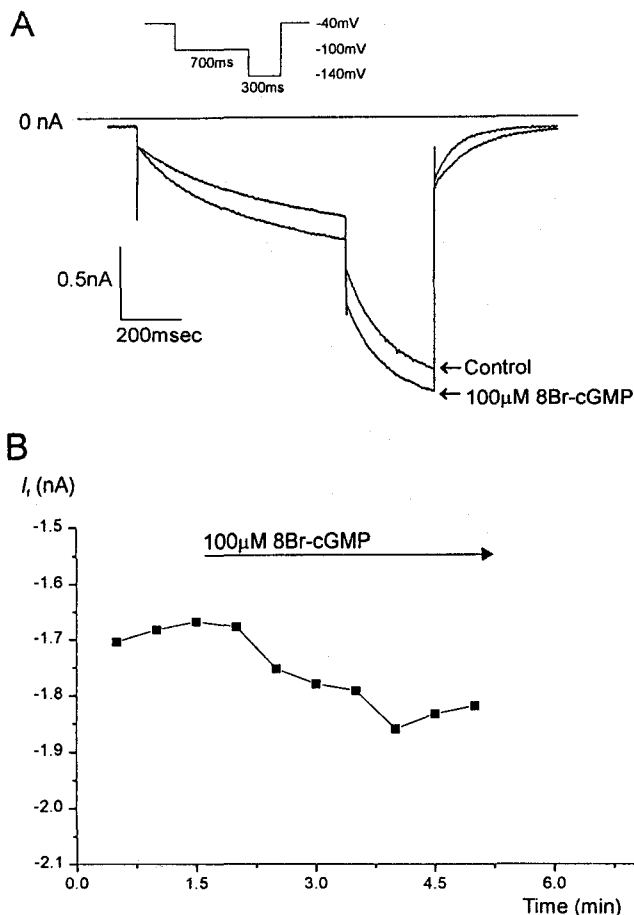
**Fig. 3.** Effect of SNP on basal  $I_f$ . A.  $I_f$  was increased and its activation was accelerated by  $80 \mu\text{M}$  SNP. B. Time course and reversibility of SNP effect on basal  $I_f$ . C. Normailized time dependent current increase during step pulse at  $-80$  mV. SNP significantly increased  $I_f$  compared with the control group (n=4).



**Fig. 4.** Changes of  $I_f$  activation curve by SNP. A.  $1 \mu\text{M}$  ISO shifted the activation curve rightward.  $80 \mu\text{M}$  SNP shifted activation curve in opposite direction. B. SNP shifted activation curve rightward at basal  $I_f$ . Considering stimulatory effect of ISO and SNP on basal  $I_f$ , the effect of SNP was smaller than that of ISO.

IBMX 존재하에 SNP의  $I_f$ 에 대한 효과

이에 증가된  $I_f$ 에 대한 SNP의 억제 기전이 PDE를 경유할 가능성을 확인하고자, 비특이적 PDE 억제제인 3-isobutyl-1-methylxanthine (이하 IBMX)을 사용하였다. IBMX ( $20 \mu\text{M}$ )를 전처치하면  $I_f$ 가 증가되었고 이어 SNP ( $80 \mu\text{M}$ )를 가하자 ISO로 증가된  $I_f$ 가 억제될 때와는 달리 아무런 변화가 나타나지 않았다(Fig. 7-A, B).  $-80 \text{ mV}$ 로 pulse를 주고 있는 동안 시간에 따라 증가하는 전류의 크기를 비교하면, IBMX처치로  $1.54 \pm 0.04$ 로 증가하였고 이어 SNP를 가하여도  $1.58 \pm 0.38$ 로 IBMX에 의한  $I_f$ 의 증



**Fig. 5.** Effect of 8Br-cGMP on basal  $I_f$ . A.  $100 \mu\text{M}$  8Br-cGMP, membrane permeable, more potent PK G activator than cGMP and worse PDE activator than cGMP, increased  $I_f$ . B. The time course of  $I_f$  change.

가는 SNP에 의해 감소되지 않았다(Fig. 7-C).

고 찰

심실근의 여러 이온 전류에 미치는 cGMP의 작용기전은 다음 3가지가 보고되고 있다. 첫째로 cGsPDE (cGMP-stimulated phosphodiesterase)가 촉진되어 cAMP를 분해 하는 경우를 들 수 있는데 개구리 심실근 칼슘 전류의 감소 기전으로 보고되었다(Fischmeister & Hartzell, 1986). 두 번째로 PKG (cGMP-dependent protein kinase)를 촉진하여 이온 통로나 이온 통로를 조절하는 단백질을 인산화 함으로써 cAMP 농도와 관계 없이 효과를 나타내는 경우가 있다. PKG 촉진으로 guinea-pig이나 쥐 심실근 칼슘 전류는 감소되었으나(Levi et al, 1989) 토끼 심실근

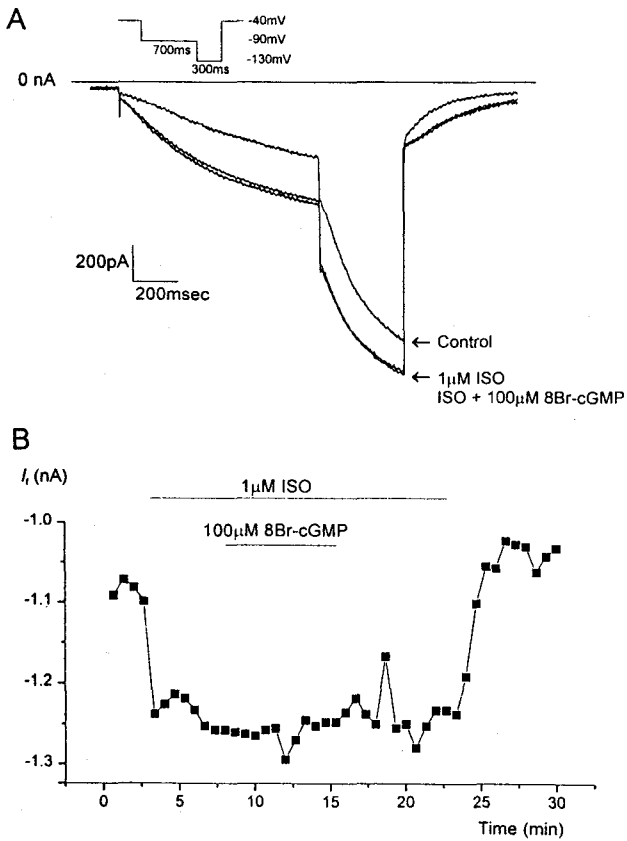


Fig. 6. Effect of 8Br-cGMP on ISO-stimulated  $I_f$ . A. 100 mM 8Br-cGMP did not change 1  $\mu$ M ISO-stimulated  $I_f$ . B. Time course of  $I_f$  change.

칼슘전류는 증가되었다고(Han et al, 1993) 보고되었다. 세번째로 cGiPDE (cGMP-inhibited phosphodiesterase)를 억제하여 cAMP분해가 억제되는 경우를 들 수 있는데 개구리 심실근과 사람 심방근 칼슘 전류의 증가 기전으로 보고되었다(Fischmeister & Hartzell, 1990; Kirstein et al, 1995). 본 연구에서는 cGMP의  $I_f$ 에 대한 효과가 칼슘 전류의 조절에서처럼 PKG나 PDE가 매개되어 있을 가능성을 확인하였다. 연구 결과 cGMP의  $I_f$ 에 대한 효과는 cAMP를 증가시키지 않았을 때와 증가시켰을 때 서로 다르게 나타났다.

cAMP를 증가시키지 않은 상태에서 guanylyl cyclase를 활성화하여 cGMP를 증가시키는 SNP를 가하였을 때  $I_f$ 는 증가하였고(Fig. 3) 활성화곡선은 최대로 활성화되었을 때의 전도도의 변화 없이 우측으로 이동되었다(Fig. 4). 그리고 PKG를 활성화 하는 효과가 큰 8Br-cGMP를 가하였을 때도 전류가 증가하였다(Fig. 5). 위의 결과는 PKG 활성화가 cGMP에 의한 basal  $I_f$ 증가에 관여할 가능성이 있음을 시사하나 활성화곡선이 우측으로 이동되는 것이

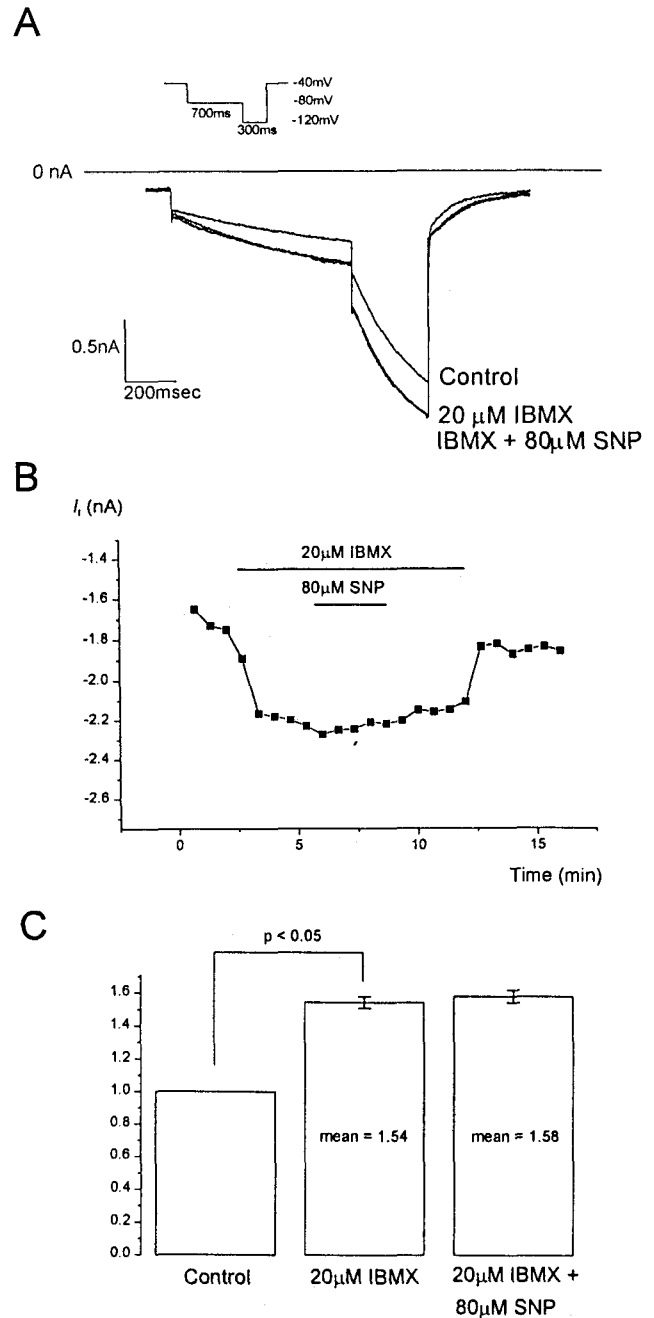


Fig. 7. Effect of SNP on IBMX-stimulated  $I_f$ . A.  $I_f$  was increased by 20  $\mu$ M IBMX. 80  $\mu$ M SNP did not reverse the effect of IBMX. B. Time course of  $I_f$  change. C. Normalized time dependent current increase during step pulse (-80 mV). IBMX significantly increased  $I_f$  compared with the control group (n = 3). Addition of SNP did not change IBMX-stimulated  $I_f$ .

cAMP에 의한 변화 양상과 같기 때문에 이점에 대한 확인이 필요하다.

ISO로 cAMP를 증가시킨 뒤 cGMP를 가하면  $I_f$ 가 control level까지 감소되었고(Fig. 2) 활성화곡선도 cAMP 증가로 우측으로 이동되었다가 cGMP를 가하였을 때 거의 control로 되돌아갔다(Fig. 4).  $I_f$ 를 IBMX처치로 PDE를 억제하여 증가시켰을 때는 cGMP를 가하여도  $I_f$ 가 억제되지 않는 것으로 보아서(Fig. 7) cAMP로 증가된  $I_f$ 가 cGMP로 억제되는 것은 cGMP에 의해 활성화되는 PDE가 cAMP를 분해하였기 때문으로 해석할 수 있겠다.

결론적으로 cGMP는 basal  $I_f$ 를 PKG를 활성화하여 증가시키며 cAMP로 증가된  $I_f$ 는 cGMP-stimulated PDE를 활성화하여 세포내 cAMP를 낮춤으로써 억제함을 알 수 있었다.

최근에 nitric oxide / cGMP pathway가 동방결절 칼슘 전류에 대한 acetylcholine의 작용에 관여한다는 보고가 있었으나  $I_f$ 에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다(Han et al, 1994). 앞으로  $I_f$ 조절에 관한 cGMP와 cAMP를 증가시키는 생리학적 agonist, 특히 acetylcholine과의 상관관계에 대해서 더 연구가 필요하다고 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 서울대학교 의과대학 교육연구재단(1995) 및 한국과학재단(한-일 공동 연구과제, 1996)의 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참 고 문 헌

- Accili EA, Redaelli G, DiFrancesco D. Differential control of the hyperpolarization-activated current( $i_f$ ) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 500: 643-651, 1997
- Anand-Srivastava MB, Trachte GJ. Atrial Natriuretic Factor Receptors and Signal Transduction Mechanisms. *Pharmacol Rev* 45: 455-97, 1993
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 347-351, 1993
- Brown AM. Regulation of heartbeat by G-protein coupled ion channels. *Am J Physiol* 259: H1621-1628, 1990
- Brown HF, Giles W, Noble SJ. Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *J Physiol* 271: 783-816, 1977
- Brown HF, Noble D, Noble SJ, et al. What accounts for adrenaline-induced rate changes in rabbit sino-atrial node? *J Physiol* 345: 27p, 1983
- Chang F, Cohen IS, DiFrancesco D, Rosen MR, Tromba C. Effects of protein kinase inhibitors on canine purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current  $i_f$ . *J Physiol* 440: 367-384, 1991
- Clapham DE. Direct G protein activation of ion channels? *Annual Review of Neurosciences* 17: 441-464, 1994
- Corbin JD, Ogreid D, Miller JP, Suva RH, Jastorff B, Odskeland SO. Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 261: 1208-1214, 1986
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current( $i_f$ ) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 377: 61-88, 1986
- DiFrancesco D, Tromba C. Muscarinic control of the hyperpolarizing-activated current  $i_f$  in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol* 405: 493-510, 1988
- DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 243: 669-671, 1989
- DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-147, 1991
- Feelisch M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solution. *J Cardiovasc Pharmacol* 17(suppl 3): S25-S33, 1991
- Fischmeister R, Hartzell HC. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on  $Ca^{2+}$  current in single heart cells. *Nature* 323: 273-275, 1986
- Fischmeister R, Hartzell HC. Regulation of calcium current by low-Km Cyclic AMP Phosphodiesterases in cardiac cells. *Molecular Pharmacology* 38: 426-433, 1990
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100, 1981
- Han X, Shimoni Y, Giles W. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J Physiol* 476: 309-314, 1994
- Han J, Leem C, Ahn C, So I, Kim E, Ho W, Earm Y. Effect of cyclic GMP on the calcium current in rabbit ventricular myocytes. *Korean J Physiol* 27: 151-162, 1993



- Hartzell HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and 2nd messenger systems. *Prog Biophys Mol Biol* 52: 165–247, 1988
- Ishibashi T, Hamaguchi M, Kato K, et al. Relationship between myoglobin contents and increases in cyclic GMP produced by glycerol trinitrate and nitric oxide in rabbit aorta, right atrium and papillary muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347: 553–61, 1993
- Kirstein M, Rivet-Bastide M, Hatem S, Bénardeau A, Mercadier J, Fischmeister R. Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J Clin Invest* 95: 794–802, 1995
- Levi RC, Alloatti G, Fischmeister R. Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 413: 685–687, 1989
- Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Arch* 366: 45–52, 1976
- Van Ginneken AC, Giles W. Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-activated inward current  $I_f$  in single cells from rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 434: 57–83, 1991
- Wu JY, Cohen IS. Tyrosine kinase inhibition reduces  $i_f$  in rabbit sinoatrial node myocytes. *Pflügers Arch* 434: 509–514, 1997
-