

## 적출 심근의 칼륨경축에 대한 칼슘이온 효과

서울대학교 의과대학 생리학교실

최 윤 백 · 김 기 환

=Abstract=

### Effect of $Ca^{++}$ on High K-induced Contracture of Isolated Frog Ventricular Muscle

Youn Baik Choi and Ki Whan Kim

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

The sufficient myoplasmic  $Ca^{++}$  to react with the contractile proteins is necessary to induce contraction of a cardiac muscle. These  $Ca^{++}$  for the production of muscle contraction are supplied from the three recognized  $Ca^{++}$  sources; internal  $Ca^{++}$  release via the sarcoplasmic reticulum(SR),  $Ca^{++}$  influx through a gated Ca-channel in the membrane as a Isi, and  $Ca^{++}$  transport by the mechanism of Na/Ca exchange. However, it is still controversial which  $Ca^{++}$  sources act as a main contributor for myoplasmic  $Ca^{++}$ . Therefore, this study was undertaken in order to examine the  $Ca^{++}$  sources for the contraction of frog ventricle. There is evidence that the SR is sparse in frog ventricular fibers, and that T-tubules are absent.

Isolated ventricular strips of frog, *Rana nigromaculata*, were used in this experiment. Isometric tension was recorded by force transducer, and membrane potentials of ventricular muscles were measured through the intracellular glass microelectrodes, which were filled with 3M KCl and had resistance of 30~50 M $\Omega$ . All experiments were performed at room temperature in a tris-buffered Ringer solution which was aerated with 100% O<sub>2</sub>. Isotonic high K, low Na solution was used to induce K-contracture. K-contracture appeared at the concentration of 20 to 30mM-KCl and was potentiated in parallel with the increase in KCl concentration. The contracture had two components; an initial rapid phasic and a subsequent slow tonic contractile responses.

Membrane potentials measured at normal Ringer solution(2.5mM KCl) was -90 to -100 mV, and decreased linearly as the KCl concentration increased; -55mV at 20mM-KCl, -45 mV at 30 mM-KCl, -30 mV at 50 mM-KCl, and -12 mV at 100 mM-KCl. K-contracture was evoked firstly at the membrane potential of -45 mV.

The contracture was potentiated by the increase of bathing extracellular  $Ca^{++}$  concentration. However, in the absence of  $Ca^{++}$  the contracture was almost not induced by 50 mM-KCl solution.

Caffeine(20mM) in normal Ringer solution, which is known to release  $Ca^{++}$  from SR without substantial effects on the  $Ca^{++}$  fluxes across the surface membrane, did not affect membrane potential and also not initiate contracture, but the caffeine in 20 mM-KCl Ringer solution produced a contracture.

Above results suggest that the main  $Ca^{++}$  source for the K-contracture of frog ventricle is  $Ca^{++}$  influx through the voltage-dependent Ca-channel, and that in the K-contracture at the concentration of 100 mM-KCl, the mechanism of Na/Ca exchange also partly contributes, in addition to the  $Ca^{++}$  influx.

## 서 론

심장수축에  $Ca^{++}$ 이 필요하다는 사실은 Sydney Ringer(1883)의 개구리 심장을 이용한 실험결과에서 증명되었다. 즉 용액중에  $Ca^{++}$ 이 없으면 심장박동이 멈춘 사실로부터 이것의 중요성이 인식되기 시작하였다. 그후의 많은 실험을 통하여  $Ca^{++}$ 이 심장기능의 여러 과정에 중요한 일을 하고 있음이 밝혀지게 되었다.

생리적으로는 세포막의 전기적 흥분이 수축단백질의 수축으로 진행되는 과정인 흥분 수축 연결(Excitation-contraction coupling, EC-coupling; Sandow, 1965) 과정에서 세포의  $Ca^{++}$ 이 세포내 즉 근장내  $Ca^{++}$ 농도를 어떠한 기전으로 결정함으로써 수축의 크기를 조정하는 흥분 수축 매개작용이 있음을 증명하는 여러가지 실험적 근거가 있다. 즉 활동전압의  $Ca^{++}$ 전류로서 세포내로 들어간  $Ca^{++}$ 은 세포내  $Ca^{++}$ 저장고(Sarcoplasmic reticulum, SR 혹은 mitochondria)에서 수축에 필요한 양만큼의  $Ca^{++}$ 을 유리시키는 작용이 있는 것 같다(Winegrad and Shanes, 1962; Niedergerke, 1963; Beeler and Reuter, 1970; Vassort, 1973; Bassingthwaite and Reuter, 1972; Morad and Goldman, 1973).

수축에 필요한  $Ca^{++}$ 공급원은 세포내  $Ca^{++}$ 저장고와 세포의  $Ca^{++}$ 의 세포막을 통한 유입으로 대별될 수 있겠으나 근육의 종류에 따라 많은 차이점을 보이고 있다. 그러나 일반적으로 골격근에서처럼 세포내  $Ca^{++}$ 저장고인 근장그물(SR)등의 발달이 잘 되어있는 근육에서는 세포의  $Ca^{++}$ 은 덜 중요하나, 평활근과 같이 SR의 발달이 미약한 근육에서는 수축에 필요한  $Ca^{++}$ 공급원으로서 세포의  $Ca^{++}$ 이 매우 중요시 되고 있다(Fleckenstein, 1977). 심장근은 골격근과 평활근의 중간정도로 근장그물의 발달이 되어 있어  $Ca^{++}$ 공급원은 세포내외가 모두 중요시 되고 있는 것이다.

개구리 심실근의 경우에는 SR이 발달되어 있지 않으므로(Staley and Benson, 1968; Hillman, 1975) 수축에 동원되는  $Ca^{++}$ 은 주로 세포막을 통하여 유입된다(Anderson et al., 1977; Kavalier, 1978). 개구리의 심실근은 심방근 보다 근장그물이 더 빈약하다(Hill-

an, 1975).  $Ca^{++}$ 의 세포막을 통한 경로를 추적하기 위하여 세포밖  $K^+$ 농도를 높이거나 막전압 고정법으로 세포막 전압을 변동시키거나(Niedergerke, 1956; Kavalier, 1959; Morad and Orkand, 1971; Winegrad, 1979), 세포의  $Na^{++}$  및  $Ca^{++}$ 농도를 변화시켜 Na-Ca 교환기전에 미치는 영향을 관찰하는 방법들이 쓰인다(Niedergerke, 1963; Chapman, 1974; Reuter, 1974; Chapman and Tunstall, 1980) 실제 수축에 동원되는  $Ca^{++}$ 공급원 및 경로에 대하여는 근육의 종류, 실험동물 등에 따라 차이가 많으며 실험방법에 따라서도 논란이 많다(Mullins, 1981).

본 실험에서는 수축에 동원되는  $Ca^{++}$ 공급원과 경로를 밝히기 위하여 SR 발달이 매우 빈약한 개구리 심실근을 이용하여 높은 농도의  $K^+$ 과 낮은 농도의  $Na^+$ 을 함유한 등장성 tris-완충 Ringer 용액으로 칼륨 경축(K-contracture)을 유발시키고 동시에 세포내에 쫓은 미세전극으로 막전압의 변화를 기록하면서 세포의  $Ca^{++}$ 농도변화와 caffeine에 대한 반응을 관찰하였다.

## 실험 방법

실험동물로 개구리(*Rana temporaria*, *Rana nigromaculata*)를 사용하였다. 개구리의 뇌와 척수를 파괴시킨 후 개흉하여 심장을 체외로 적출하여 실온에서( $18^{\circ}\sim 20^{\circ}C$ ) 100%  $O_2$ 로 포화되어 있는 개구리용 tris-완충 Ringer 용액( $NaCl$  115.5,  $KCl$  2.5,  $CaCl_2$  1.8, tris 10, glucose 5 mM; pH 7.35)이 들어있는 준비용기내에서 심방과 심실의 경계부를 따라 가위로 잘라 심실을 분리시켰다. 원추형의 심실을 절개하여 심실내강을 열고 가능하면 trabeculae의 주행방향을 따라 무게(wet wt.) 2 mg, 길이 5 mm 내외의 심실근 절편을 만들어 체내길이대로 근육고정기에 고정된 후 한시간 이상 충분한 산소를 공급하면서 방치 회복시켰다.

다음에 적출하여 회복시킨 심실근을 실온에서 100%  $O_2$ 로 포화된 tris-완충 링저액이 들어있는 용량 100 ml의 수직형 실험용기(vertical chamber)에 옮긴 후 근육고정기의 한쪽 끝을 장력 변환기(Grass FT 03)에 연결시키고 수축곡선을 그릴 수 있도록 Physiograph

(Devices MX 6)를 장치하였다.

30분간 회복시킨 뒤 자극기(Grass S4)로 문턱자극의 2배 강도로 자극빈도 0.2 Hz의 자극을 가하면서 근육의 길이를 단계적으로 늘려 길이 장력 관계를 관찰하고 최적길이를 결정한 후 그 상태에서 다시 30분간 안정 회복시킨 뒤 실험을 시작하였다.

경축을 유발하기 위한 고농도의 K-경축용액은 K 100 mM 및 KO(K-free)인 링거용액을 적절히 섞어 K<sup>+</sup>농도가 20, 30, 50, 100 mM이 되도록 하였으며 삼투질농도 변화를 막기 위하여 증가된 K<sup>+</sup>양만큼 Na<sup>+</sup>을 줄였다. caffeine은 원하는 양을 가루로 미리 달아 놔 두었다가 그대로 용액 중에 넣어 원하는 농도로 맞추어 사용하였다.

막전압의 측정을 위한 실험용기로 3 ml 용량의 수평형 실험용기(horizontal chamber)를 사용하였다. 6 ml/min 정도로 링거액을 관류시키면서 유리 미세전극을 사용하여 막전압의 변화를 기록하였다. 유리 미세전극은 3 M KCl로 채웠고 전기저항이 30~50 MΩ인 것만을 골라 사용하였다. 이때에도 막전압을 기록하면서 동시에 등장성 장력 변환기(Collins 계)로 수축곡선을 기록하였다.

### 실 험 성 적

그림 1에 최적길이에서 전기자극 빈도수에 따른 등

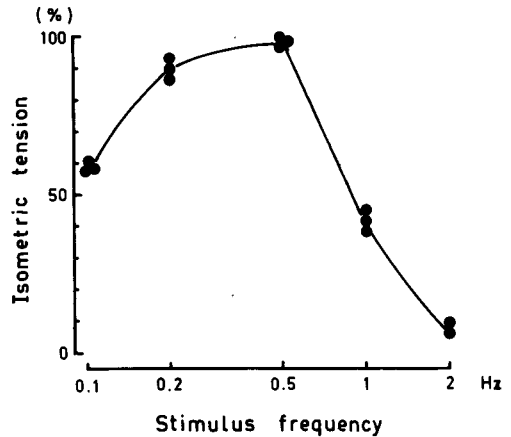


Fig. 1. Force-frequency curve under steady-state conditions at optimal length in frog ventricular muscles. The ventricular strips were stimulated electrically with the various frequencies of DC square pulses at room temperature, and maximum tension was produced at the frequency of 0.5 Hz.

장성 수축의 변화양상을 나타내었다. 0.1~0.5 Hz 범위에서는 빈도수가 증가할수록 수축크기가 증가하여 0.5 Hz에서 최고치에 도달함을 보여주고 있다. 그러

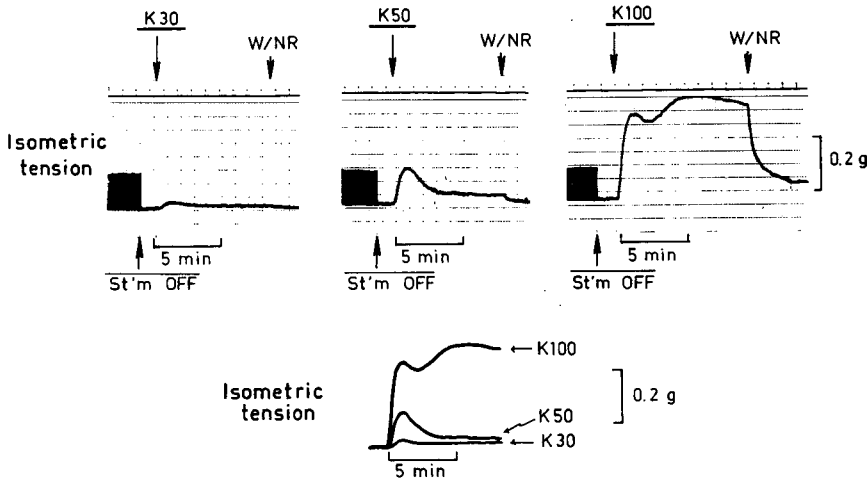


Fig. 2. Dependence of contracture on KCl concentration. Biphasic contracture, rapid initial phasic and slow subsequent tonic contraction, was developed by the exposure of frog ventricle to high K and low Na Ringer solution. As the extracellular K concentrations increase, the amplitudes of contractures increase. The tonic component of K-contracture was more remarkably potentiated at the concentration of K 100 mM. The ventricular strip was stimulated with 0.5 Hz DC square pulses, and wet weight was 1.7 mg.

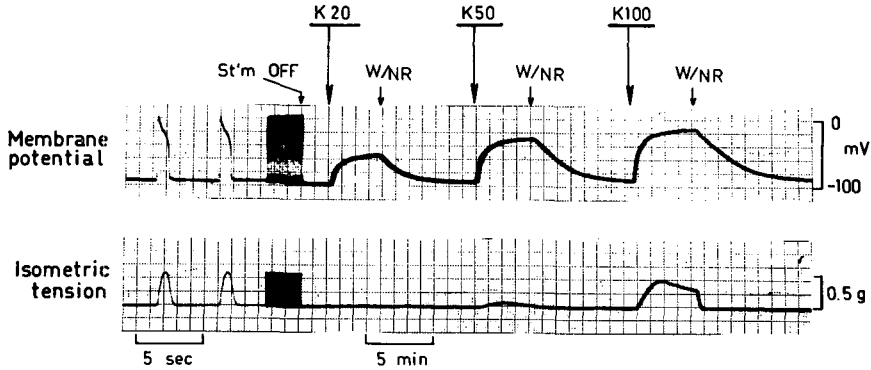


Fig. 3. Dependence of membrane potential on KCl concentration. Upper trace, membrane potential; lower trace, isometric tension. The membrane potentials measured by conventional glass microelectrode technique at the concentrations of K 2.5, 20, 50, 100 mM were -96, -56, -30, and -14mV respectively.

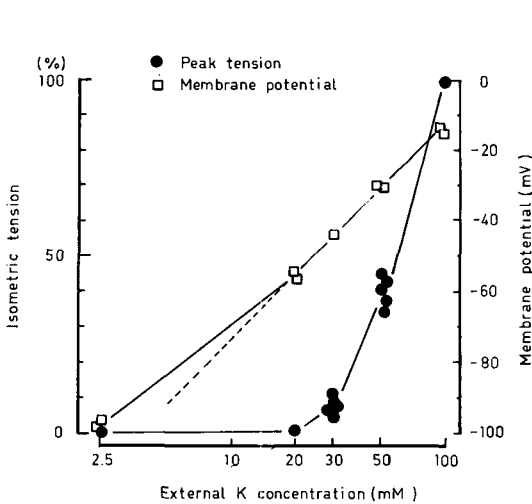


Fig. 4. Relations between KCl concentration and isometric tension, and between KCl concentration and membrane potential. This diagram reveals that the threshold of K-contracture is on the range of K 20 to 30 mM, and the membrane potentials decrease linearly at the concentrations of 20 to 100mM-KCl.

나 더 빨리 자극하면 즉 1,2 Hz로 자극하면 오히려 수축크기가 떨어지고 있다. 그래서 연속을 일으키는 자극은 0.2~0.5 Hz로 자극하였다.

K-경축을 여러번 일으키기 위하여 K-링저용액으로

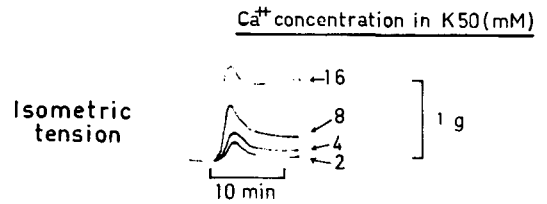


Fig. 5. Dependence of K-contracture on extracellular  $Ca^{++}$  concentrations. Contractures with 50mM-KCl Ringer solutions, but varying  $Ca^{++}$  concentrations. As the  $Ca^{++}$  concentrations increase, the amplitudes of K-contracture(both phasic and tonic components) increase.

같이할 경우, 경축변화를 서로 비교하기 위하여 연속의 크기가 같을 경우라야 수축성(contractility)이 같은 조건으로 판단하여 실험을 진행하였다.

### 1) 세포의 $K^+$ 농도와 K-경축의 크기

그림 2와 그림 4에 세포의  $K^+$ 농도에 따른 경축의 변화모습을 나타내었다. 전기자극을 끊고 1분후 K 30 mM에 심실근을 노출시키면 느린 경축곡선이 나타나고 있으나 50, 100 mM로  $K^+$ 농도를 높이면 전형적인 이상성(biphasic) 경축현상이 나타나고 있다. 그림 2의 하단에 이것을 중첩시켜 놓았다. 즉 세포의  $K^+$ 농도가 증가함에 따라 K-경축은 빠르고 크게 나타났으며 초기의 위상성 성분(initial phasic component)과

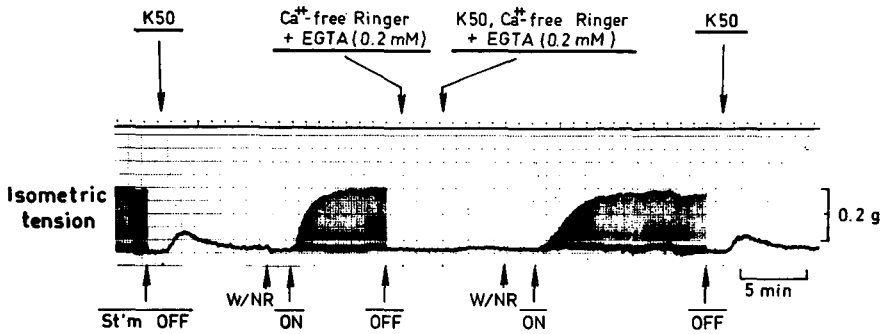


Fig. 6. The effect of  $\text{Ca}^{++}$  concentration on the K-contracture. In the absence of  $\text{Ca}^{++}$  in bathing media ( $\text{Ca}^{++}$ -free Ringer solution), contracture was not developed even at the 50mM-KCl solution.

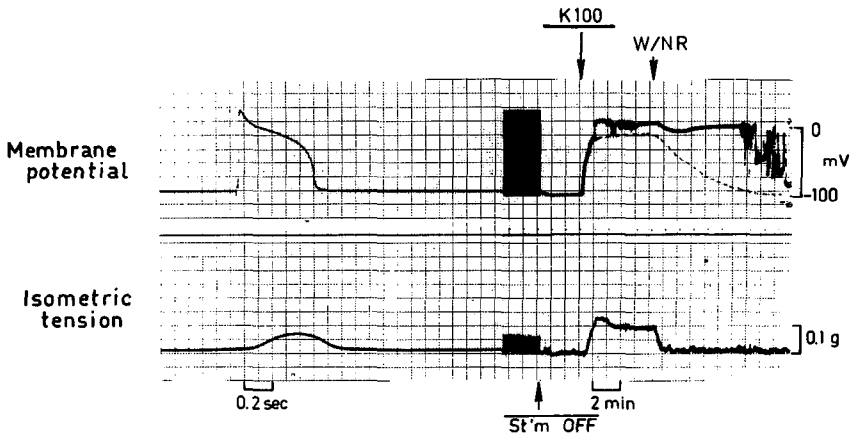


Fig. 7. Relation between membrane potential and isometric tension. Upper trace, membrane potential; lower trace, isometric tension. The membrane potential was maintained steadily at -12 mV during the exposure to 100 mM-KCl solution, but the typical biphasic contracture was developed even at the constant membrane potential.

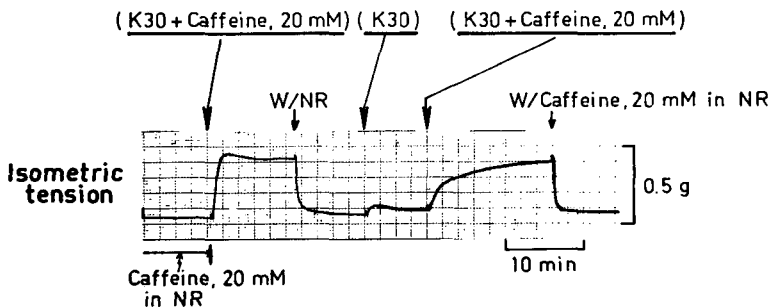


Fig. 8. Effect of caffeine on K-contracture. Caffeine(20mM) in normal Ringer solution, which is known to release  $\text{Ca}^{++}$  from the sarcoplasmic reticulum, did not induce contracture in frog ventricular strip. But caffeine in 30mM-KCl solution produced a large contracture.

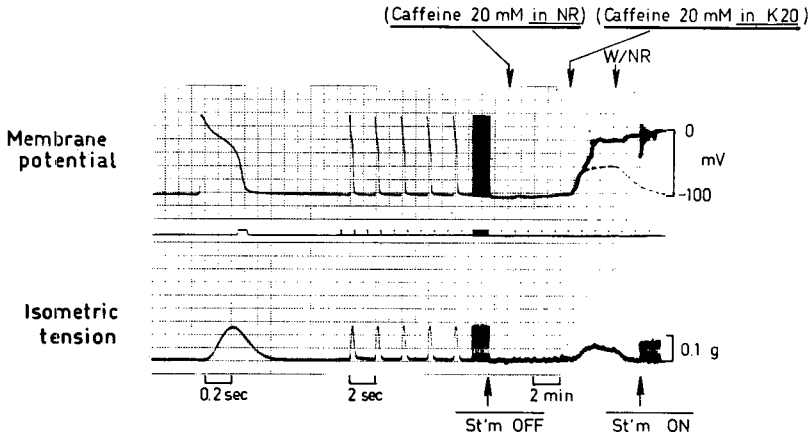


Fig. 9. Effect of caffeine on membrane potential. Resting membrane potential and isometric tension were not altered by the addition of caffeine(20mM) to normal Ringer solution. But the caffeine-contracture was induced by caffeine in 20mM-KCl solution. Upper trace, membrane potential; lower trace, isometric tension.

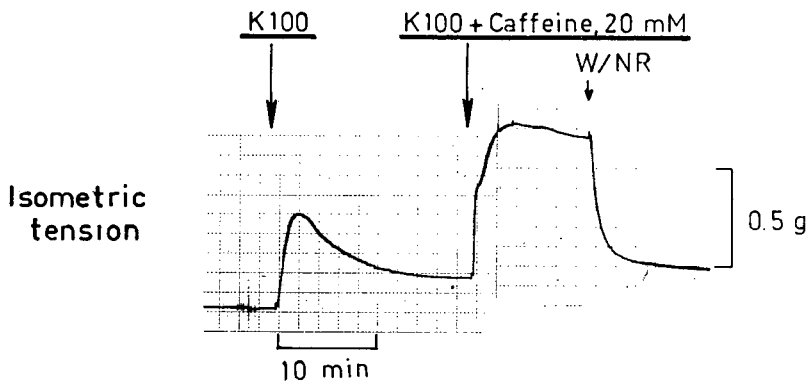


Fig. 10. Caffeine-contracture after the spontaneous relaxation of the K-contracture in isolated frog ventricular strip. The application of caffeine(20 mM) in K 100mM-KCl initiated a redevelopment of tension, after the spontaneous relaxation of contracture evoked by K 100mM-KCl solution.

뒤의 긴장성 성분(subsequent tonic component) 모두가 다 증가하고 있다. K 20 mM까지는 K-경축현상이 일어나지 않았으며(그림 4), 30 mM 정도에서 나타나기 시작하였고 K 100 mM에서 최고치에 달하였다.

## 2) 세포의 K<sup>+</sup>농도와 막전압의 변화

그림 3과 그림 4에 세포밖 K<sup>+</sup>농도에 따른 심근세포의 막전압의 변화양상을 보였다. 그림 3의 실측치를 보면 정상 링거액(K, 2.5 mM)에서 막전압은 -96mV 이었다가 K 20 mM 용액으로 갈아주니 막전압이 처음에는 급히 감소하다가 나중에는 서서히 감소하여 일정

상태에 도달하여 막전압은 -56 mV를 나타내었다. 다시 정상 링거액으로 갈아주니 서서히 재분극되어 원래 막전압으로 돌아오고 있다. K 50 mM에서 막전압은 -30 mV, K 100 mM에서 -14 mV임을 보여주고 있다. K 100 mM 용액에서 막전압과 등장성 장력곡선의 시간경과의 차이를 보면 K 100 링거액으로 갈아주자 곧 막전압의 급속한 감소가 일어나고 얼마 있다고(10 초정도) 장력이 나타나기 시작하였다. 막전압이 일정 상태에 도달하여 일정한 값을 보여주고 있으나 등장성 장력은 그 사이에 이상성 경축곡선을 그렸다. 정상 링거용액으로 갈아주면 막전압은 서서히 재분극되나 오

히려 장력곡선은 더욱 빠른 속도로 이완되었다(그림 3 그림 7).

그림 4에서 보면 K20~100 mM 범위에서 세포의 K<sup>+</sup> 농도와 막전압 사이에서는 직선적인 관계를 보이고 있으나 그 이하에서는 직선적인 관계에서 벗어나고 있음을 볼 수 있다.

### 3) K-경축과 세포의 Ca<sup>++</sup>

그림 5와 그림 6에 K-경축에 세포의 Ca<sup>++</sup>이 어떻게 영향을 미치는 가를 나타내었다. K50 mM 링거액으로 K-경축을 일으킬 경우 세포의 Ca<sup>++</sup> 농도를 2 mM 에서 4, 8, 16 mM 로 증가시킬 경우 경축의 크기는 두 성분(위상성과 긴장성 성분) 모두 증가하였다(그림 5) 세포의 Ca<sup>++</sup>을 모두 없앨 경우(Ca<sup>++</sup>-free Ringer+ EGTA, 0.2 mM), K50 mM 로 막전압을 탈분극 시키더라도 약간의 긴장성 성분은 나타났으나 거의 경축현상은 나타나지 않고 있다(그림 6).

### 4) K-경축과 caffeine

세포내 Ca<sup>++</sup>저장고 특히 근장그물(SR)로부터 Ca<sup>++</sup>을 유리시키는 작용이 있다고 알려진 caffeine 과 경축과의 관계를 그림 8, 9, 10에 나타내었다.

정상(K, 2.5 mM) 링거용액에 20 mM caffeine 이 포함된 용액에서도 심실근은 전혀 수축반응을 보이지 않고 있으며(그림 8), 이때 막전압도 변하지 않았다

(그림 9). 그러나 K20이나 K30 mM 링거용액에 20 mM caffeine 을 넣은 용액으로 바꿔주자 곧 빠른 속도로 경축반응이 나타났다. 그러나 그림 8에서 caffeine 에 대한 수축반응의 시간경과를 비교하여 보면 caffeine 으로 전처치한 경우가, 미리 K30 mM 로 전처치하여 막전압을 탈분극시킨 때보다 빠른 속도로 최고값에 도달하였다. K100 mM 로 이상성 K-경축을 일으킨 뒤 여기에 다시 caffeine 20 mM 을 투여한 결과 더욱더 강력한 경축현상이 일어나고 있다(그림 10).

링거용액에서 Na<sup>+</sup>을 완전히 없애고 tris 로 대체시켜 삼투질 농도를 맞춘 용액(Na-free Ringer)에 노출시키면 막전압의 변화는 별로 없으나 서서히 경축반응이 일어나고 있다(Na-free contracture)(그림 11).

## 고 찰

심장에서의 흥분 수축 연결도 모든 근육수축에서와 같이 근장(sarcoplasm)내의 Ca<sup>++</sup>농도에 의하여 결정되는바, 이 Ca<sup>++</sup>은 세포내 저장고, 막전압에 의하여 좌우되는 Ca<sup>++</sup>통로(Ca-channel) 및 세포막을 통한 Na-Ca 교환등에 의하여 공급된다고 알려져 있다(Mul-lins, 1981).

세포내 Ca<sup>++</sup>저장고로는 근장그물(SR)이 제일 중요하고 그외 미토콘드리아도 어느정도 Ca<sup>++</sup>저장고의 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 이와 같은 세포내 Ca<sup>++</sup>저장고인 SR의 발달정도가 동물에 따라 달라서 포유류와 개구리의 심장을 비교하면 개구리 심장은 포유류에 비하여 훨씬 미약하고, 또한 개구리 심장의 경우 심방근 보다 심실근의 발달이 매우 빈약하다(Stalley and Benson, 1968; Hillman, 1975). SR의 발달정도가 미약할 경우에는 다른 Ca<sup>++</sup>공급원인 세포막의 Ca<sup>++</sup>통로를 통한 것과 Na/Ca 교환에 의한 부분이 상대적으로 그 중요성이 커져서 세포의 Ca<sup>++</sup>농도나, Na<sup>+</sup>농도변화에 따라 민감하게 수축크기가 좌우된다(Fabiato and Fabiato, 1979).

용액내 Ca<sup>++</sup>, 즉 세포의 Ca<sup>++</sup>이 심근수축에 필요하다는 사실이 Sydney Ringer(1883)에 의하여 관찰된 이래 이에 대한 많은 업적이 쌓이게 되었다. 심근수축시에 Ca<sup>++</sup>유입(Ca<sup>++</sup> influx)이 증가되는 사실이 알려지면서(Winegrad and Shanes, 1962; Niedergerke, 1963), 세포의 Ca<sup>++</sup>이 세포내 Ca<sup>++</sup>농도를 어떤 기전으로 결정함으로써 수축의 크기를 조정하는 즉 완만내향전류(slow inward current, Isi)인 Ca<sup>++</sup>전류가 흥분 수축간의 중요한 매개작용을 하지 않을까 하는

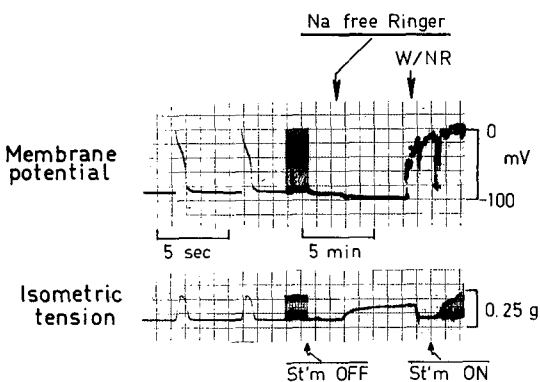


Fig. 11. Na-free contracture initiated by sodium-depleted solution in isolated frog ventricular strip. Resting membrane potential was almost not changed by the exposure of preparation to Na-free Ringer solution. Upper trace, membrane potential; lower trace, isometric tension. W/NR, washout with normal Ringer.

추축을 하게 되었다.

이러한 추축은 막전압 고정법을 이용한 많은 실험에서 사실임이 입증되었다(Beeler and Reuter, 1970; Vassort, 1973; New and Trautwein, 1972; Gibbons and Fozzard, 1975).

장력의 크기와 막전압사이의 관계를 보면 안정막전압에서 30 mV 만큼 탈분극 시켰을 때 장력이 증가하기 시작하여 탈분극 정도가 커질수록 S자상으로 급격히 증가하기 시작하여 0 mV 정도에서 최고치에 도달하는 것으로 보아 확실히 수축의 상당부분은  $Ca^{++}$  유입이 활성화되는 것과 연관함을 짐작할 수 있다(Beeler and Reuter, 1970).  $Ca^{++}$  전류와 장력과의 관계를 보면 수축의 크기는  $Ca^{++}$  전류가 증가함에 따라 커져서,  $Ca^{++}$  전류가 최고에 이르렀을 때 장력발생이 가장 크게 나타났다(Vassort, 1973).

심근수축에는 수축단백질(contractile proteins)의 활성화 과정에  $Ca^{++}$ 이 필요한데(Ebashi and Endo, 1968), 활동전압으로 들어간  $Ca^{++}$  전류가 직접 수축기구의 활성화에 관여하지 않을까 하는 견해는 여러가지 실험성적으로 보아 맞지않고, 이때  $Ca^{++}$  전류로서 세포내로 들어간  $Ca^{++}$ 은 세포내  $Ca^{++}$  저장고(SR 혹은 mitochondria)에서 수축에 필요한 양만큼의  $Ca^{++}$ 을 유리시키는 작용이 있는 것 같다(Bassingthwaite and Reuter, 1972; Morad and Goldman, 1973).

세포막을 통한 Na-Ca 교환(Na/Ca exchange)으로 일어나는  $Ca^{++}$  이동은 개구리 심장을 이용한 실험, 즉 Ringer 용액내  $Na^{++}$ 을 없앤 용액에 노출시키면 일시적인 경축현상이 일어나는(Na-free contracture) 것으로서 실험적으로 이 기전의 존재를 증명하고 있다. 세포의  $Na^{++}$  농도의 감소가 세포막을 통한  $Ca^{++}$  이동에 미치는 영향은 일찍부터 알려져 왔다(Daly and Clark, 1921). 현재의 지견으로는 적어도 두가지 방향으로 설명된다(Langer, 1982). 그중 하나는 세포막 표면의 음이온을 띤  $Na^{+}$ ,  $Ca^{++}$  결합부위에서의 상호관계이고(Lüttgau and Niedgerke, 1958; Chapman and Tunstall, 1969; Horackova and Vassort, 1979). 다른 하나는 세포막의 carrier를 통한 Na/Ca 교환이다(Reuter and Seitz, 1968; Glitsch et al., 1970; Bers and Ellis, 1982). 이러한 기전들을 통하여 세포의  $Na^{+}$ 이 낮아지면 세포표면의 음이온을 띤 결합부위에 붙는  $Ca^{++}$ 의 양이 많아져 세포내로의 이동이 증가하고 Na-Ca 교환기전을 통한  $Ca^{++}$  세포의 유출을 억제하여 결과적으로 세포내  $Ca^{++}$ 이 증가하고 장력이 증가하나, 세포밖의 낮은  $Na^{+}$  농도 때문에 궁극적으로는 세

포내  $Na^{+}$ 이 감소되고 이에 따라 세포의  $Ca^{++}$  유입이 줄어들어 장력은 기초상태로 되돌아 온다고 생각된다. 실제로 수축에 동원되는  $Ca^{++}$  중 얼마만큼이, 어느 경로를 통하여 동원되는가에 대하여는 아직도 논란이 많다.

실험적으로 수축에 동원되는  $Ca^{++}$ 의 경로를 밝히는 데는 어느 한 경로에만 영향을 미치는 실험방법이 개발되어야 하나 아직은 어려운 점이 많다. 흔히 쓰이는 방법으로는 근장그물로부터  $Ca^{++}$ 을 유리시키는 화학물질들을 처리하든지(Endo, 1977), 세포의 K 농도를 높이거나 막전압 고정법에 의하여 막전압을 변동시키든지(Niedgerke, 1956; Kavalier, 1959; Morad and Orkand, 1971; Winegrad, 1979) 또는 세포의  $Na^{+}$ , Ca-농도를 변화시켜 Na-Ca 교환에 미치는 영향을 관찰하는 방법(Niedgerke, 1963; Chapman, 1974; Reuter, 1974; Chapman and Tunstall, 1980) 등이다.

본 실험에서 높은 농도의 K<sup>+</sup>과 낮은 농도의 Na<sup>+</sup>을 함유한 용액으로 처리하였을 때 유발된 경축은 수분이내에 최대 장력에 도달한 후 서서히 감소하는 이상성(biphasic) 경축이었다. 개구리 심방근을 이용한 Chapman과 Tunstall(1981)의 칼륨경축 실험에서도 이상성 경축현상은 더욱 뚜렷한데 이들은 K-경축의 위상성 부분은 고농도의 K<sup>+</sup>에 의한 탈분극이 세포내 저장고로부터  $Ca^{++}$ 을 유리시키고 또한  $Ca^{++}$  통로를 통해 세포로부터 유입되는  $Ca^{++}$ 에 의한 것이고, 긴장성 부분은 Na-Ca 교환에 의하여 나타난다고 하였다. 심실근의 경우 위상성 부분이 뚜렷하지 않은데(Niedgerke, 1956; Goto et al., 1971) 이는 개구리 심실근이 심방근 보다 근장그물의 발달이 빈약하기 때문일 것이다.

본 실험의 이상성 경축중 위상성 부분은 K20 mM에서는 거의 나타나지 않고 그 이상에서만 관찰되었는바(그림 2, 3, 4), K 경축의 역치가 20~30 mM이라는 점(Niedgerke, 1956; Morad and Orkand, 1971; Chapman and Tunstall, 1981)과 본 실험의 막전압 실험치인 안정막전압 -96 mV, K20 mM -56 mV, 에서 K30 mM에서 -45 mV를 감안할 때, 세포막의 탈분극으로 인한  $Ca^{++}$  통로의 개방과 세포밖  $Na^{++}$  감소로 세포표면의 결합부위에  $Ca^{++}$ 이 많이 결합하는데 기인된 것으로 해석된다. K100 mM에서 긴장성 성분이 현저히 커지는 것은(그림 2) 세포밖  $Na^{+}$  정도가 30 mM 이상일 때는 이와 관련된  $Ca^{++}$ 의 세포의 유출이 포화되나 30 mM 이하에서는  $Ca^{++}$ 의 유출도 저하된다는 보고(Langer et al., 1976; Wendt and Langer,



1977)로 미루어 세포밖  $\text{Na}^+$ 의 감소에 의한  $\text{Ca}^{++}$  유출의 억제에 따른 결과로 해석된다.

세포밖  $\text{Ca}^{++}$  농도를 변화(0, 2, 4, 8, 16 mM)시켰을 때 K-경축(K 50 mM)을 보면(그림 5, 6)  $\text{Ca}^{++}$  농도증가에 따라 K-경축의 위상성 및 긴장성 성분이 모두 증가하였으나 Ca-free 용액에서는 거의 나타나지 않는 것으로 보아 K50 mM로 인한 K-경축에는 세포밖으로부터의  $\text{Ca}^{++}$  유입이 가장 중요한  $\text{Ca}^{++}$  공급원으로 판단된다.

caffeine은 골격근에서 연축(twitch)과 경축(contraction)을 강화시키는데 이것은 이 약물이 SR에서  $\text{Ca}^{++}$  유리를 일으키는데 기인한 것으로 해석되고 있다(Weber & Herz, 1968).

caffeine의 이러한 SR에 대한 작용은 기본적으로 평활근이나 심근에도 같으나 SR의 발달정도가 골격근과는 많은 차이가 있어 이로 인한 차이가 생겨날 수 있다. 본 실험에서 보면 caffeine 20 mM 만으로는 막전압의 변화도 없고(그림 9) 경축현상이 일어나지 않았지만(그림 8, 9), K경축액으로 막전압을 탈분극시킨 상태에서 caffeine이 존재하면 반드시 경축현상이 일어나는 것으로 보아(그림 8, 9, 10) K경축액으로 막전압이 탈분극되어  $\text{Ca}^{++}$  유입이 일어나 세포내  $\text{Ca}^{++}$  저장고가 포화된 상태에서 Caffeine이 작용하여 경축이 일어난 것으로 해석된다.

## 결 론

근육수축에 동원되는  $\text{Ca}^{++}$  공급원( $\text{Ca}^{++}$  sources) 및 경로에 대하여는 근육의 종류, 실험동물 등에 따라 차이가 많으며 실험방법에 따라서도 논란이 많다. 심장근은 세포내 중요  $\text{Ca}^{++}$  저장고인 근장그물(SR)의 발달이 골격근과 평활근의 중간정도이고, 개구리는 포유류의 심장에 비하여 훨씬 덜 발달되어 있어 세포의  $\text{Ca}^{++}$ 이 중요 공급원으로 알려져 있다. 특히 개구리 심실근은 심방근보다 SR이 더 빈약한 것이 특징이다.

본 실험에서는 수축에 동원되는  $\text{Ca}^{++}$  공급원과 경로를 밝히기 위하여 SR 발달이 매우 빈약한 개구리 심실근 절편을 이용하여 높은 농도의  $\text{K}^+$  링거용액으로 막전압을 탈분극시켜 칼륨경축(K-contraction)을 유발시키고, 동시에 유리미세전극으로 막전압을 기록하면서 세포의  $\text{Ca}^{++}$  농도를 변화시키고 caffeine에 대한 반응양상을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 칼륨경축은 K30 mM 정도에서 나타났고  $\text{K}^+$  농도증가에 따라 경축발생속도와 크기가 증가하였다.

2) 막전압은 실온에서 정상 링거액(K, 2.5 mM)에서

-90~-100 mV 이었고, K20 mM에서 -55 mV, K30 mM에서 -45 mV, K50 mM에서 -30 mV, K100 mM에서 -12 mV 정도로서 막전압이 -45 mV 근처에서 경축현상이 나타나기 시작하였다.

3) 칼륨경축곡선은 두 부분으로 구성되어 있었다. 즉 처음에 급히 나타나는 위상성 수축성분(initial phasic component)과 계속하여 서서히 장력이 유지되는 지속성 수축성분(subsequent tonic component)으로 나눌 수 있었다.

4) 칼륨경축곡선의 두 성분은 세포의  $\text{Ca}^{++}$  농도(2, 4, 8, 16 mM)를 높여주면 모두 다 강화되었으며  $\text{Ca}^{++}$ -free 링거액 내에서는 경축반응은 아주 약한 지속성 성분은 남아 있었으나 거의 나타나지 않았다.

5) caffeine 20 mM 만으로는 경축현상이 일어나지 않았으나, K20 mM로 막전압은 탈분극되거나 경축은 일어나지 않는 데에 caffeine 20 mM을 투여하면 뚜렷한 경축현상이 일어났다. 그러나 caffeine 존재하에서 정상 링거용액으로 바뀌어서 재분극시킬 경우 경축현상은 급히 사라졌다.

이러한 실험결과들은 개구리 심실근의 경우 칼륨경축시의 중요  $\text{Ca}^{++}$  공급원은 세포밖의  $\text{Ca}^{++}$  통로를 통한  $\text{Ca}^{++}$  유입이 제일 중요하고  $\text{K}^+$  농도가 100 mM인 경우에는 Na-Ca 교환기전도 여기에 어느정도 관여하는 것으로 해석된다.

## REFERENCES

- Anderson, T.W., C. Hirsh, and F. Kavalier: *Mechanism of activation in frog ventricular muscle. Circ. Res.*, 41:472-480, 1977.
- Beeler, G.W., and H. Reuter: *The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. J. Physiol.*, 207:211-229, 1970.
- Bassingthwaite, J.B., and H. Reuter: *Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells. In Electrical phenomena in the heart. (ed. de Mello), pp353-395, 1972. Academic Press, New York.*
- Bers, D.M., and D. Ellis: *Intracellular calcium and sodium activity in sheep heart Purkinje fibers: effect of changes of external sodium and intracellular pH. Pflügers Arch.*, 393:

- 171-178, 1982.
- Chapman, R.A.: *A study of the contractures induced in frog atrial trabeculae by a reduction of the bathing sodium concentration.* *J. Physiol.*, 237:295-313, 1974.
- Chapman, R.A., and J. Tunstall: *Evidence for the site of Na/Ca antagonism in cardiac muscle of frog, Rana pipiens.* *J. Physiol.*, 201:9-11P, 1969.
- Chapman, R.A., and J. Tunstall: *The interaction of sodium and calcium ions at the cell membrane and the control of contractile strength in frog atrial muscle.* *J. Physiol.*, 305:109-123, 1980.
- Chapman, R.A., and J. Tunstall: *The tension-depolarization relationship of frog atrial trabeculae as determined by potassium contractures.* *J. Physiol.*, 310:97-115, 1981.
- Daly, I. de Burgh, and A.J. Clark: *The action of ions upon the frog's heart.* *J. Physiol.*, 54: 367-383, 1921.
- Ebashi, S., and M. Endo: *Calcium ion and muscle contraction.* *Prog. Biophys.*, 18:123-183, 1968.
- Endo, M.: *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.* *Physiol. Rev.*, 57:71-108, 1977.
- Fleckenstein, A.: *Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle.* *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 17:149-166, 1977.
- Fabiato, A., and F. Fabiato: *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling.* *Ann. Rev. Physiol.*, 41:473-484, 1979.
- Glitsch, H.G., H. Reuter, and H. Scholz: *The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles.* *J. Physiol.*, 209:25-43, 1970.
- Goto, M., Y. Kimoto, and Y. Kato: *A study on excitation contraction coupling of bull frog ventricle with a voltage clamp technique.* *Jap. J. Physiol.*, 29:159-173, 1971.
- Gibbons, W.R., and H.A. Fozzard: *Slow inward current and contraction of sheep cardiac Purkinje fibres.* *J. gen. Physiol.* 65:367-384, 1975.
- Hillman, A.K.K.: *Ultrastructural studies of frog myocardium.* Ph. D. Thesis, University of Leicester, cited from Chapman and Tunstall (1981).
- Horackova, M., and G. Vassort: *Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility: Evidence for an electrogenic, voltage-dependent mechanism.* *J. gen. Physiol.*, 73: 403-424, 1979.
- Kavaler, F.: *Membrane depolarization as a cause of tension development in mammalian ventricular muscle.* *Am. J. Physiol.*, 197:968-970, 1959.
- Kavaler, F., T.W. Anderson, and V. Fisher: *Sarcolemmal site of caffeine's inotropic action on ventricular muscle of the frog.* *Circ. Res.*, 42:285-290, 1978.
- Kim, K.W., S.I. Hwang, and K.Y. Nam: *Different mechanisms of K-induced contracture in isolated vascular and intestinal smooth muscles.* *Korean J. Physiol.*, 13(12):41-50, 1979.
- Kim, J., J. Park, and Y.B. Park: *Effect of extracellular pH on contracture in frog ventricle.* *Seoul J. Med.*, 24(2): 175-184, 1983.
- Kim, K.W.: *Ca<sup>++</sup> current in cardiac muscle.* *Korean J. Physiol.*, 17(1):74-80, 1983.
- Lüttgau, H.C., and R. Niedergerke: *The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart.* *J. Physiol.*, 143:486-505, 1958.
- Langer, L.A., L.M. Nudd, and N.V. Ricchiuti: *The effect of sodium deficient perfusion on calcium exchange in cardiac tissue culture.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 8:321-328, 1976.
- Morad, M., and R.K. Orkand: *Excitation-contraction coupling in frog ventricle: evidence from voltage clamp studies.* *J. Physiol.*, 219:167-189, 1971.
- Morad, M., and Y. Goldman: *Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension.* *Prog. Biophys.*, 27:257-313, 1973.
- Mullins, L.J.: *Ion Transport in Heart.* Raven Press, New York, 1981.

- Niedergerke, R.: *The potassium chloride contraction of the heart and its modification by calcium*. *J. Physiol.*, 134:584-599, 1956.
- Niedergerke, R.: *Movement of Ca in frog heart ventricles of rest and during contractures*. *J. Physiol.*, 167:515-550, 1963.
- New, W., and W. Trautwein: *The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction*. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 334:24-38, 1972.
- Reuter, H., and N. Seitz: *The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition*. *J. Physiol.*, 195:45-70, 1968.
- Reuter, H.: *Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium: mechanisms and physiological significances*. *Circ. Res.* 34:599-605, 1974.
- Ringer, S.: *A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart*. *J. Physiol.*, (Lond.) 4:29-42, 1883.
- Sandow, A.: *Excitation-contraction coupling in skeletal muscle*. *Pharmacol. Rev.*, 17:265-320, 1965.
- Staley, N., and E.S. Benson: *The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling*. *J. Cell. Biol.*, 38:99-114, 1968.
- Vassort, G.: *Existence of two components in frog cardiac mechanical activity*. *Europ. J. Cardiol.*, 1:163-168, 1973.
- Winegrad, S., and A.M. Shanes: *Calcium flux and contractility in guinea-pig atria*. *J. gen. Physiol.*, 45:371-394, 1972.
- Weber, A., and R. Herz: *The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum*. *J. gen. Physiol.*, 52:750-759, 1968.
- Wendt, I.R., and L.A. Langer: *The sodium-calcium relationship in mammalian myocardium: effect of sodium deficient perfusion on calcium fluxes*. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 9:551-564, 1977.
- Winegrad, S.: *Electromechanical coupling in heart muscle*. In *Handbook of Physiology, section 2. The Cardiovascular System, Vol. I, Chap. 10, pp. 398-428, ed. Berne, R.M., American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 1976.*