

토끼 단일 심방근 세포에서 Na-Ca 교환전류의 특성에 관한 연구

염 욱* · 호원경** · 서경필***

— Abstract —

The Properties of Na-Ca Exchange Current in Single Atrial Cells of The Rabbit

Wook Youm, M.D.*., Won Kyung Ho, M.D**., Kyung Phill Suh, M.D.***

In single atrial cells isolated from the rabbit the properties of inward current of Na-Ca exchange were investigated using the whole cell voltage clamp technique. The current was 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 time course of the relaxation showed two different phases fast and slow phase. The time constants were 10-18 ms and 60-140 ms, respectively.
3. The recovery of inward current was tested by paired pulse of various interval. The peak current recovered exponentially with time constant of 140 ms and 1 μ M isoprenaline accelerated the recovery process.
4. Relaxation time course was also affected by pulse interval and time constant of the fast phase was reduced almost linearly according to the decrease of pulse interval between 30 sec and 1 sec.
5. The peak activation was increased in magnitude by long prepulse stimulation, 5 μ M Bay K, 1 μ M isoprenaline or internal and external application of c-AMP.
6. The relaxation time constant of the fast phase was prolonged by 5 μ M Bay K or c-AMP, and shortened by isoprenaline. However the time course of the slow relaxation phase was

* 한국 보훈병원 흉부외과

* Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Korea Veterans Hospital

** 서울대학교 의과대학 생리학교실

** Dept. of Physiology, College of Medicine, Seoul National University

*** 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

*** Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Seoul National University
1989년 7월 25일 접수

not so much changed.

From the above results, it could be concluded that increase of the calcium current by Bay K or c-AMP results in the potentiation and prolongation of intracellular calcium transient, and the facilitation of Ca uptake by SR might be a mechanism of shortening the time constant of current relaxation by short interval stimulation or isoprenaline.

I. 서 론

심장이 주기적인 수축작용으로 펌프의 기능을 수행하기 위하여는 세포내 Ca 농도가 주기적으로 조절되어야 한다. 세포내 Ca은 활동전압시 활성화된 Ca 통로를 통한 Ca의 유입과 근장그물에서의 Ca 유리에 의하여 급격히 증가하고, Na-Ca 교환기전과 Ca-펌프를 통한 세포밖으로의 배출 및 근장그물로의 재흡수에 의하여 감소한다. 심근 세포막의 Ca-펌프는 낮은 농도에서 포화되고 그 속도가 늦으므로⁴⁾ 세포 밖으로의 Ca 배출에 Na-Ca 교환기전이 중심적 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

심근에 Na과 Ca이 교환되는 기전이 존재함은 1958년 Lüttgau와 Niedergerke가²¹⁾ 개구리심장에서 수축의 크기를 결정짓는데 있어 Na과 Ca이 서로 길항적으로 작용함을 발견함으로써 처음 제시되었고 Reuter와 Seitz³⁰⁾가 세포밖 Na에 의존하는 ⁴⁵Ca의 efflux를 측정함으로써 증명되었다. 그 후로 많은 학자들이 방사성 동위원소로 flux를 측정하여 Na-Ca 교환기전의 특성을 연구하여 그 교환 비율이 3Na : 1Ca로서 전류발생적(electrogenic)이라는 결론에 도달하였다^{19, 29)}

Millins²⁷⁾는 교환비율을 3 : 1로 하여 교환전류를 구하는 모델을 제시하였고, 그 모델을 근거로 심장의 활동전압을 이루는 데도 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 밝혔고¹⁷⁾, Mechmann과 Pott는 caffeine으로 처리하여 근장그물에서 Ca 유리를 일으킬 때 나타나는 내향전류를 기록하고 이것이 Na-Ca 교환전류임을 밝혔다²²⁾. 이들의 실험은 직접적으로 교환전류를 기록했다는 데는 의미가 있으나 생리적인 상태에서 이루어진 것이

아니므로 생리적인 상태에서 Na-Ca 교환전류의 크기, kinetics 및 역할을 측정하는 데에 큰 도움을 주지는 못하였다.

실제 활동전압에 Na-Ca 교환기전이 역할을 하리라는 실험적 근거는 활동전압의 재분극이 빠른 시기와 느린 시기의 두 부분으로 구별되는 쥐의 심실근과 토끼의 심방근에서 많이 연구되었다. Michell 등은 쥐의 심실근에서의 late plateau 성분이 ryanodine, EG-TA나 세포 밖 Na 감소에 의해 억제되는 실험으로 세포내 Ca에 의해 활성화되는 내향전류가 관여함을 보여 주었다^{23, 24, 25, 26)}. Hilgemann은 토끼의 심방근에서 활동전압 및 수축과 함께 세포밖 Ca transient를 측정함으로써 활동전압의 초기에 세포밖 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 보였다¹¹⁾. 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 하였다¹²⁾.

한편 개구리의 심방근이나^{2, 14, 15)} guinea-pig의 심실근⁸⁾에서 Ca-전류를 발생시키는 저분극 pulse 후에 기록되는 'slow tail'이 Na-Ca 교환전류일 것이라는 증거들이 제시되었다. Earm등⁶⁾은 토끼의 단일 심방근에서 +40 mV로 2 ms 기간의 짧은 pulse를 준 후일과성으로 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 조

전 즉 자극빈도의 변화, Bay K, c-AMP, isoproterenol들의 영향을 비교분석하여 이들이 세포내 Ca 농도 조절에 어떠한 기전으로 작용하는가를 추구하고 보고자 하였다.

II. 연구 목적

2 ms의 저분극 pulse에 의해 -70 mV에서 활성화되어 일과성 내향전류를 나타내는 Na-Ca 교환전류를 기록하고 이 전류의 크기, 시간경과, 구성성분들의 기본적인 특성을 밝힌다. 아울러 자극빈도의 변화와 Bay K, c-AMP, 또는 isoprenaline 투여에 의해 위의 특성이 어떻게 영향 받는가를 비교하여 분석함으로써 세포내 Ca 농도 조절에 위의 인자들이 어떤 기전으로 작용하는가를 추구하고 본다.

III. 연구 방법

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 μM)으로 10-15분 관류시킨 다음 심방부분을 떼어내서 잘 흔들어 주고 떨어져 나온 세포들을 low Cl, high K 저장용액에 넣어 4°C에 보관하였다.

실험용액: 정상 Tyrode 용액은 (mM); NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.33; glucose, 5; HEPES, 5(pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추어)이고 전극내 용액은 (mM); K-aspartate, 100; Mg-ATP, 5; di-Tris-creatine phosphate, 5; MgCl₂, 1; KCL, 20; HEPES, 5(pH는 KOH로 적정하여 7.4로 맞추어);EGT-A, 0.1이었다.

Voltage clamp: 유리전극은 tip 저항이 2-3 MΩ인 것을 사용하였고 심방근 세포는 inverted microscope 상에 설치한 실험용기에 옮긴 후 실험용액을 1 ml/min의 속도로 관류하며 용기내 온도를 35°C로 유지하며 실험하였다. tip 저항이 2-3 MΩ인 유리전극을 전극내 용액으로 채운 후 세포막에 접근시키고 -10--20 cm H₂O의 음압을 가하여 giga seal을 만든 후 음압을 높여 세포막을 파열시킨 상태에서 whole cell voltage clamp를 하였다⁹⁾.

Na-Ca 교환전류를 보기 위하여는 Earm^등⁶⁾의 방법

으로 -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 넘어가기 전에 적어도 2번이상의 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.

IV. 연구 성적

1. Na-Ca 교환전류의 일반적 특성

Holding potential -70 mV에서 +40 mV까지의 저분극 pulse를 2 ms동안 준 후 다시 -70 mV로 되돌아왔을 때 일과성으로 나타나는 Na-Ca 교환전류를 30초 간격으로 기록하였다. 앞으로 전 실험에서 30초 간격을 항정상상태에서의 기준으로 하였다. 그 대표적인 예를 그림 1의 A에서 보이고 있다. 빠른 capacitive current 후 내향전류가 나타나는 데 그 크기가 점점 커져서 6-12 ms 후에 (mean ± S.D=9.0 ± 1.8 ms, n=15) 최대치에 이른다. 최대전류의 크기는 200 pA-400 pA사이였고 (mean ± S.D=342 ± 59 pA, n=15) 간혹 500 pA 이상을 보이는 경우도 있었다. 최대치에 이른 후 내향전류의 크기는 서서히 감소하여 100 ms 후에는 10-30 pA 이하로 되었다. 이 감소하는 양상을 그림 1C에서 semilog plot을 하였다. 최대치에 이르는 시간은 세포마다 다소의 차이가 있으므로 저분극 pulse를 주는 시점을 시작점(zero time)으로 하였고, 전류 크기에 log값을 취하여 흰 점으로 표시하였는데 전반부의 빠르게 감소하는 부분(rapid relaxation phase)과 후반부의 느리게 감소하는 부분(slow relaxation phase)으로 나눌 수 있었다. 각 부분은 거의 직선적인 관계를 보였으므로 뒤의 느린 성분을 extrapolation하여 실측치와의 차이를 구해 검은 점으로 plot하여 두 성분으로 나누었다. 빠른 성분의 시정수(time constant)는 주로 10-18 ms 사이였고 느린 성분의 시정수는 60-140 ms 사이에 있었다. 느린 성분은 대개 그

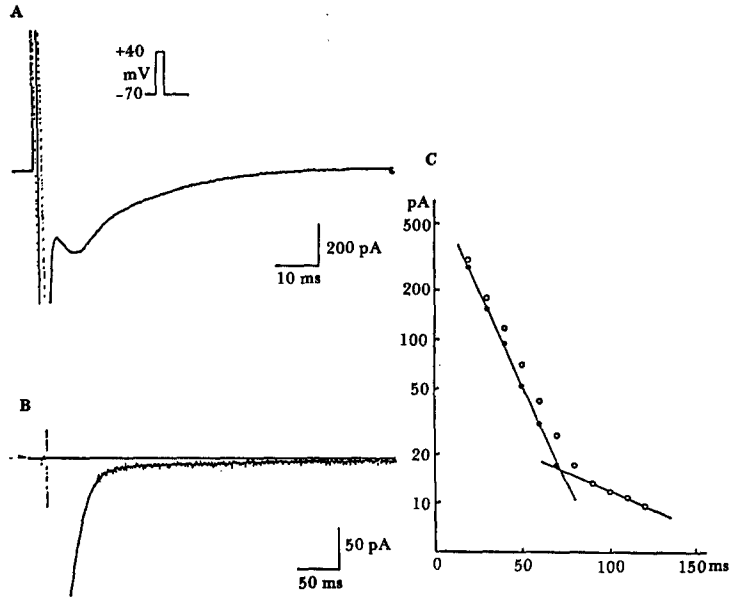


Fig. 1. A typical record of Na-Ca exchange current. A) Upper trace shows the voltage clamp pulse which is used in all the subsequent experiments. From the holding potential of -70 mV, $+40$ mV of 2 ms duration pulse was applied every 30 sec. Lower trace shows current recording. During 2 ms depolarization, inward Na and Ca current and transient outward current were activated but all of these were off the scale. On returning to -70 mV, inward current of Na-Ca exchange was activated. B) The same data was shown in different scale and speed. The slowly relaxing component can be seen easily while the early part of the relaxation are off the scale. Arrow indicates the holding current level. C) The time course of current relaxation was plotted on a semilog graph. Open circles were total measured current and filled circles were differences between the values of open circle and of extrapolated slow component. Time constant of fast phase was 18 ms and that of slow phase was 94 ms.

크기가 10–30 pA로 작으므로 그 성분을 확실히 보기 위해서 그림 1B에서 sensitivity를 크게하여 느린 속도로 다시 기록하여 보았다. 크기는 작으나 서서히 감소하는 부분이 존재함을 확실히 볼 수 있다.

— 최대전류의 회복(recovery)경과

$+40$ mV, 2 ms 기간의 자극 pulse를 그 간격을 바꾸며 두개씩 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 간격의 기준자극을 여러번 주어 일정한 전류가 기록됨을 확인

한 후에 실험자극을 가하였다.

그림 2는 내향전류가 다 감소하기 전에 두번째 pulse를 5 ms, 20 ms, 40 ms 간격으로 준 실험을 겹쳐서 그린 것이다. 여기서는 두번째 pulse에 의해 더 이상의 내향전류가 활성화되지는 않고, 원래의 current trace를 거의 그대로 따라가는 양상을 보이고 있다. 그림 3A에서는 첫번째 pulse에 의한 교환전류가 거의 없어진 후인 100 ms, 200 ms, 400 ms, 800 ms에서 두번째 pulse를 주었을 때의 결과이다. 위 그림은 30초 간격으로 한번씩 자극했을 경우의 기준기록을 나타낸다. 아래는 여러 간격의 pulse에서 두번째 pulse에 의한 전류를 보이고 있다. capacitive current와 교환전

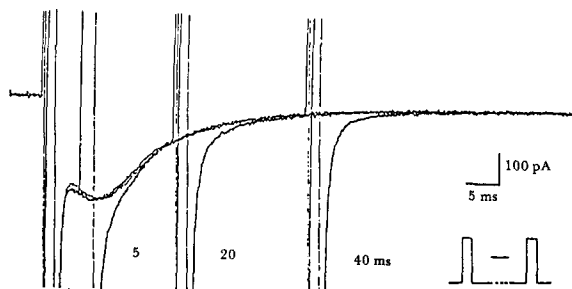


Fig. 2. Na-Ca exchange currents activated by paired pulses of short interval. 5, 20, and 40 ms interval paired pulses were applied during steady state stimulation (30 sec interval) and these records were superimposed. The currents after the second pulses did not show further activation and followed the original current trace as if there was no interruption.

류의 경계를 정확히 구분짓기는 어려우나, 자극 간격을 점차 늘림에 따라 capacitive current의 extrapolation과는 차이가 나는 내향전류 성분이 점차 증가하는 것을 볼 수 있다.

서로 다른 다섯 예의 실험에서 비슷한 양상을 관찰할 수 있었으며 자극간격에 따른 교환전류 최대치의 변화를 그림 3B에 plot해 보았다. 서로 다른 간격의 자극에서 capacitive current와 구별되는 내향전류의 최고값을 30초 간격의 기준자극에서의 최대치를 기준(100%)으로 하여 나타내었다. 그림에서와 같이 뚜렷한 지수함수 곡선으로 그릴 수 있었고 semilog plot에서 직선적 관계를 보였으며 시정수는 140 ms였다.

— 자극 간격과 전류 감소의 시간 경과와의 관계

그림 3에서 보면 내향전류의 최대치는 800 ms 후엔 거의 회복되어 기준자극에서의 값과 비슷해 지지만 최대치에 이르는 시간과 최대치후 감소하는 시간 경과에 control과 비교하여 큰 차이가 있음을 알 수 있다. 그림 4A에서 30초 간격의 자극에서와, 1초 간격의 자극에서 나타나는 교환전류의 기록을 겹쳐서 그려 보았는데 최대치에 이르는 시간과 전류 감소의 시간 경과가 현저히 빨라지는 것을 볼 수 있다.

그림 4B에서 A의 기록을 그림 1에서와 같은 방법으로 plot하여 각 성분의 변화를 비교해 보았다. 빠른 성분의 시정수는 18 ms에서 10 ms로 현저히 감소하였고 느린 성분의 시정수는 94 ms에서 88 ms로 큰 변화를 보이지 않음을 알 수 있었다. 그림 5A는 또 다른 세 포

에서의 기록으로 자극 간격을 30초에서 10, 5, 1초로 줄임에 따라 전류감소의 시간 경과가 빨라지는 것을 볼 수 있다. 그림 5B에서 다른 한 예와 함께 자극 간격에 따른 빠른 성분의 시정수의 변화를 plot하여 보았는데 교환전류 감소의 빠른 성분이 자극 간격에 의해서 직선적으로 변함을 알 수 있었다.

2. Prepulse에 의한 변화

본 실험에서와 같이 토끼 심방근에서 짧은 pulse 후에 나타나는 Na-Ca 교환전류는 근장근에서의 Ca의 유리에 의해 활성화 되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 그렇

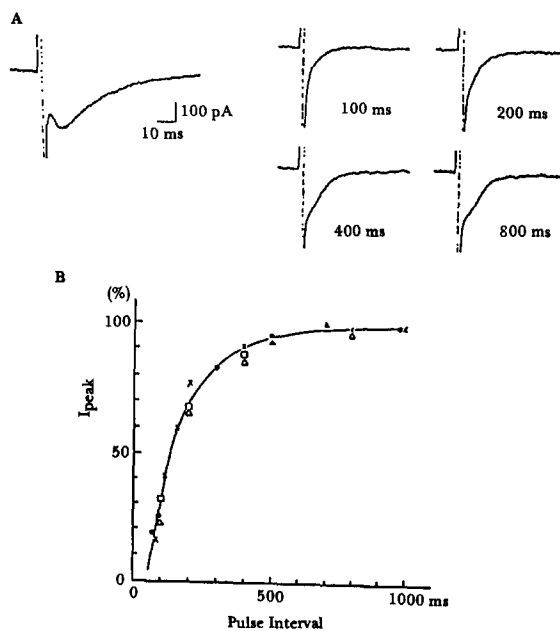


Fig. 3. The recovery of Na-Ca exchange current. A) The left upper record is the control Na-Ca exchange current obtained by steady state stimulation (30 sec interval). Right upper and lower records show the currents activated by second pulses when paired pulse stimulation were applied. 100, 200, 400, 800 ms indicates the interval of paired pulse. The inward current component increased according to the increase of interval. B) The relation of the paired pulse interval to the peak inward current. Abscissa: Paired pulse interval. Ordinate: Amplitudes of the peak current were represented as percent fraction relative to that of steady state current (30 sec interval). Different symbols represent different experiments. The line was drawn by eye and shows an exponential relation.

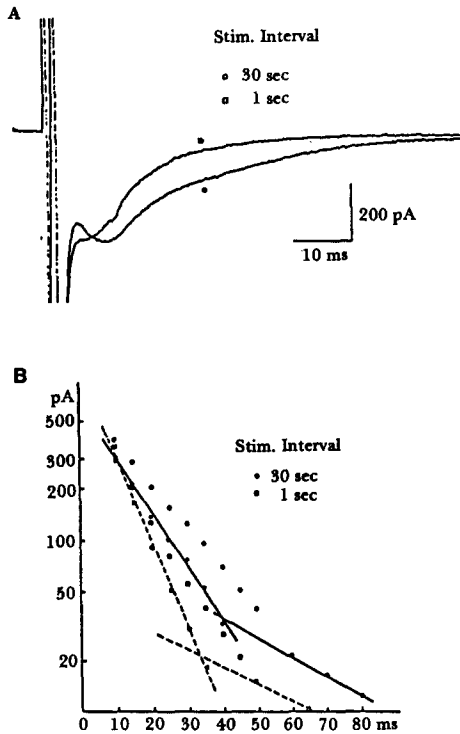


Fig. 4. The effect of stimulation interval on the Na-Ca exchange current. A) Na-Ca exchange current during steady state stimulation (open circle, 30 sec interval) and 1 sec interval (open square) were superimposed. The difference of the time course of relaxation could be noticed. B) The results in A were plotted in the same method as shown in figure 1C. Time constant of the fast component was shortened by a short interval stimulation.

다면 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 그림 6의 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(그림 6A). 전류감소의 시간경과는 prepulse의 기간과는 관계가 없이 prepulse를 준 경우 모두 빨라졌고, 이는 그림 4-5의 실험에서 본 것과 같이 자극간격이 짧아진 효과로

설명할 수 있겠다. 그림으로 보이지는 않았지만 prepulse의 회수 및 크기 변화도 교환전류의 최대치에 영향을 주었다. 긴 prepulse의 경우 횡수가 많을수록 더욱 증가하였고, prepulse의 크기가 30 mV 이하에서는 전류증가를 볼 수 없었다. 따라서 교환전류가 세포내 Ca에 의해 활성화 되는 것임을 생각할 때 prepulse에 의해 유입된 Ca이 근장그물에 저장되었다가 그 다음의 pulse에 의해 활성화되는 교환전류의 크기에 영향을 주는 것으로 해석할 수 있겠다.

그림 6B에서는 이와 동일한 효과를 활동전압의 변화에서도 볼 수 있음을 나타낸다. A와 B는 같은 세포에서의 기록은 아니나 긴 prepulse에 의해 활동전압의 late plateau가 높아지는 효과는 A에서의 교환전류의 내향성분이 커지는 변화와 잘 일치한다.

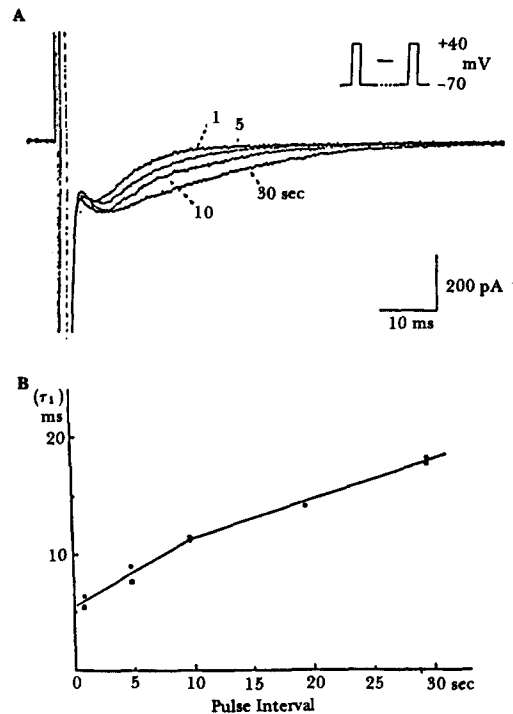


Fig. 5. The effect of stimulation interval on the relaxation of Na-Ca exchange current. A) 1, 5, 10, 30 sec indicate the stimulation interval. The current relaxations became faster as the stimulation intervals were shortened. B) The relationship between the stimulation intervals and time constants of fast component of current relaxation. It shows nearly linear relation between 1 to 30 sec.

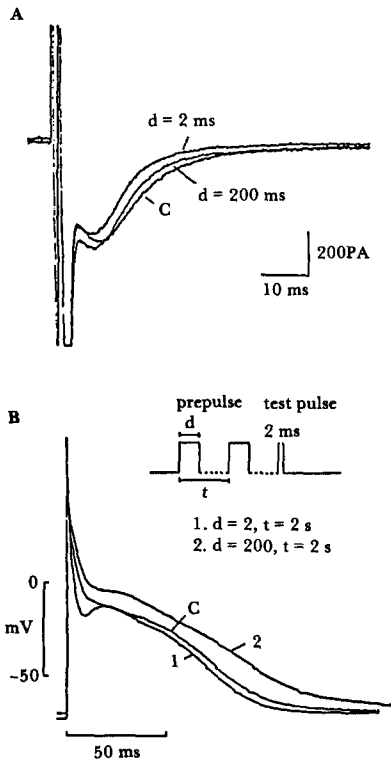


Fig. 6. Potentiation of the Na-Ca exchange current and action potential plateau by long prepulse. Inset shows pulse protocol. A) Relative to the control current without prepulse, the current after the prepulse stimulation was relaxed faster. The peak current was potentiated when the prepulse duration was 200 ms long. B) The effect of prepulse on the late plateau was very similar to that on the Na-Ca exchange current shown in A.

3. Bay K에 의한 영향

Earm⁶⁾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 5 μ M의 Bay K를 주었을 때의 효과를 실험하여 보았다. 5 μ M Bay K에 의하여 내향전류의 최대치가 증가하였고(mean: 120%, n=3), peak에 이르는 시간은 2.7 ms 정도 지연되었다(n=3). 세 번의 실험에서 모두 전류감소의 시간 경과가 느려졌는데, 그림 7A의 실험결과를 B에서 plot

하여 보았다. 이 경우는 느린 성분의 크기가 아주 작아서 무시하고 빠른 성분의 시정수만 구하였는데 Bay K에 의하여 6.8 ms에서 13 ms로 느려짐을 알 수 있었다. 그림 8에서는 Bay K에 의한 활동전압의 변화

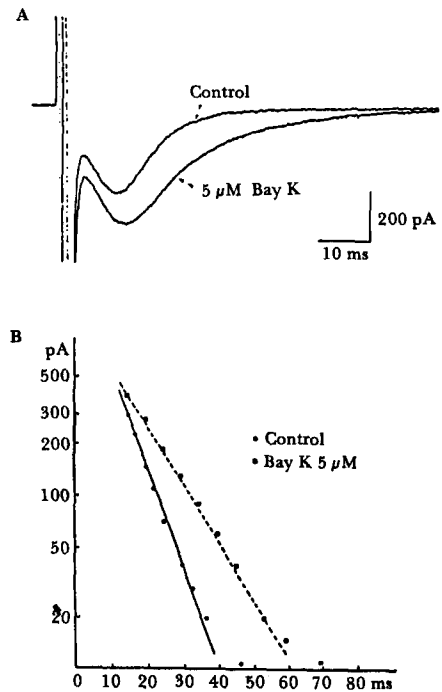


Fig. 7. The effect of Bay K on the Na-Ca exchange current. A) The superimposed current recording before (control) and after application of 5 μ M Bay K. B) The semilog plot of current relaxation. Time constant was increased by Bay K.

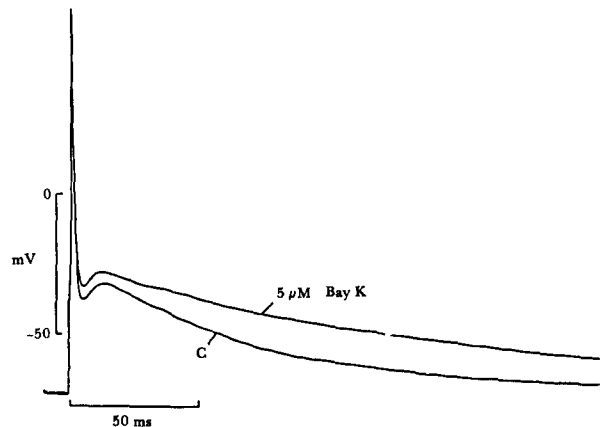


Fig. 8. The Effect of Bay K on the action potential. It can be noticed that the late plateau is elevated and prolonged by 5 μ M Bay K.

를 보이고 있다. 초기의 빠른 재분극에 변화가 없으나 plateau가 5 mV가량 높아지고 후반부 재분극이 현저히 느려져서 Na-Ca 교환전류에 대한 Bay K의 효과와 잘 일치하였다.

4. c-AMP에 의한 영향

β -수용체는 여러 기전을 통하여 심장의 기능을 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 실험들을 통해 증명되었다³²⁾. 그러나 β -수용체의 작용이 모두 c-AMP를 통한 것이라고 단정지을 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. 세포내 c-AMP가 Na-Ca 교환전류에 주는 영향을 보기 위하여 우선 전극내 용액에 10 μ M의 c-AMP를 첨가한 후 세포막을 파열(rupture)시킨 직후에 기록한 교환전류가 시간이 경과함에 따라 어떻게 변화하는가를 관찰하였다. 그림 9A에서 보듯이 시간이 경과함에 따라 그 크기가 점점 증가하였는데 이는 c-AMP가 세포내로 확산해 들어가며 나타나는 효과로 볼 수 있겠다. 그림 9B에서는 c-AMP를 첨가한 경우의 특징적인 활동전압을 보이고 있는데 plateau가 현저히 높아 0 mV까지 이르고 활동전압 기간이 200-300 ms로 매우 길었다. 여기에 1 μ M의 ryanodine을 첨가하였을 때 높은 plateau가 모두 억제되는 것으로 보아 높은 plateau 형성에 근장그물에서 분비되는 Ca이 관여함을 알 수 있고, 따라서 A에서 본 바와 같은 Na-Ca 교환전류의 증가가 높은 plateau 형성의 기전으로 결론지을 수 있겠다. 다음엔 c-AMP에 의한 Na-Ca 교환전류의 변화를 동일세포에서 비교하기 위하여 세포막을 통과 할 수 있는 dibutyryl c-AMP를 1 mM 첨가하여 보았다(그림 10A). 앞의 실험에서와 같이 최대전류치가 증가하였고(320 pA→440 pA) 최대치에 이르는 시간은 8 ms에서 9 ms로 느려졌으며 전류감소의 시간경과도 느려지는 것을 보였다. 그림 10B에서 A의 결과를 plot하였는데 전류감소의 빠른 성분의 시정수는 10 ms에서 18 ms로 느려졌으며

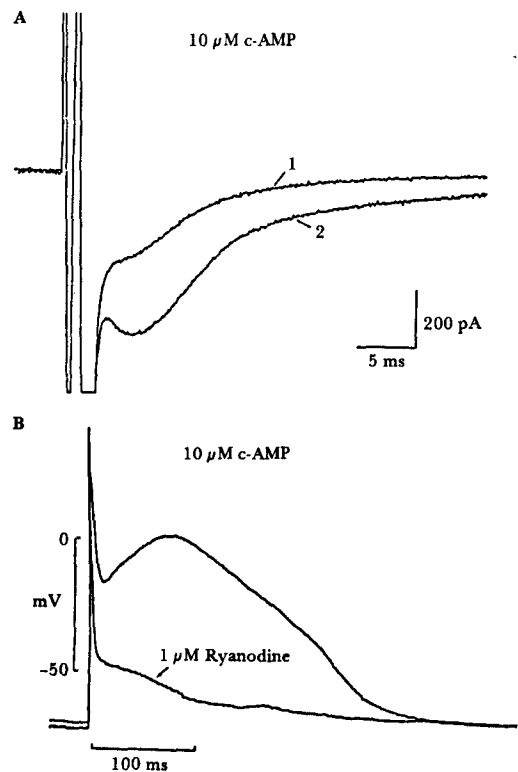


Fig. 9. Na-Ca exchange current and action potential recording in the presence of 10 μ M c-AMP in the pipett solution. A) Na-Ca exchange current - current obtained just after the rupture of the membrane(1) and 7 min after (2). The current increased along the time and became steady after 7 min. Note the very large inward current (560 pA). B) The late plateau level is very higher (up to 0 mV) and the duration is very longer, compared to the normal action potential in Fig. 8. The prominent plateau was almost abolished by 1 μ M ryanodine.

느린 성분의 시정수는 60 ms에서 58 ms로 거의 변화가 없었다. 따라서 c-AMP의 효과는 Bay K로 Ca-전류를 증가시킨 효과와 거의 유사한 것으로 생각되었다.

5. Isoprenaline (isoproterenol)에 의한 영향

그림 11A에서 1 μ M isoprenaline을 첨가한 경우 Na-Ca 교환전류의 변화를 특징적으로 보여주고 있다. 변화의 양상을 요약하면 내향전류의 최대치가 증가하고(mean: 160%, n=3), 최대치에 이르는 시간이 1-2 ms 빨라지며 전류감소가 빨라지는 것으로 말할 수 있다. 그림 11B에서 전류감소의 시간 경과를 plot하였는데 빠른 성분의 시정수 뿐 아니라 느린 성분의 시정

V. 고 찰

Earm 등⁶⁾의 방법으로 기록한 내향전류는 그 여러 가지 특성—EGTA의 영향, ryanodine의 효과, 세포내 Ca 및 Na 농도 경사에 대한 의존성, 전류-전압관계등—으로 보아 세포내 Ca transient에 의해 활성화된 Na-Ca 교환전류로 생각된다. 이러한 특성들은 Mitchell 등^{25,26)}이 쥐와 guinea-pig의 심실근에서, 또는 Fedida 등⁸⁾이 guinea-pig 심실근에서 Ca-전류를 활성화시키는 저분극 pulse를 준 후 나타나는 slow tail current에 관한 연구 결과와도 잘 일치한다. 그러나 기록된 전류의 양상은 큰 차이를 보여 Mitchell 등과 Fedida 등의 실험에서는 전류가 느리게 감소하는 tail로 나타나는데 반해서 (half time of decay: 150 ms)

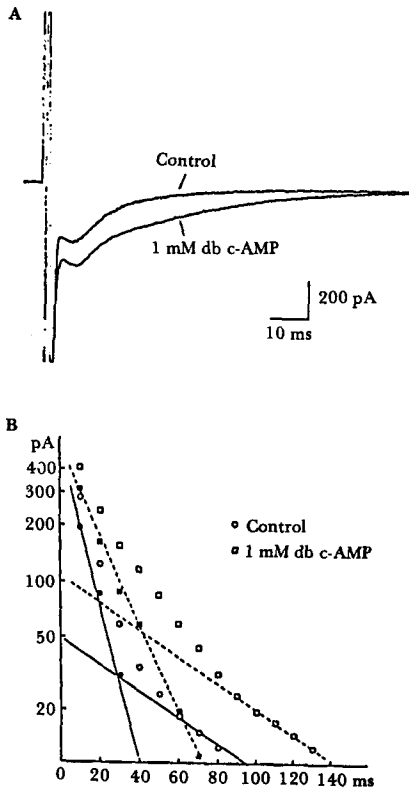


Fig. 10. The effect of 1 mM dibutyryl c-AMP on the Na-Ca exchange current. A) The current recordings were superimposed before (control) and after application of 1 mM dibutyryl c-AMP. B) The time courses of current relaxation were plotted by the same method in Fig. 1C.

수도 다소 감소하는 것으로 보여진다. 그림 12에서는 그림 3 실험에서와 같이 서로 다른 간격의 paired pulse를 주며 Na-Ca 교환전류를 기록하며 교환전류의 회복에 미치는 isoprenaline의 효과를 관찰하였다. A는 isoprenaline을 첨가하기 전으로 그림 3의 결과와 마찬가지로 120 ms 후에 내향전류의 최대치는 50% 정도 밖에 되지 않고 400 ms에서나 상당한 크기로 회복되고 있다. B는 isoprenaline에 의한 변화로 100 ms 후에 벌써 상당한 정도의 내향전류가 나타나며 200, 400 ms 후에는 정확한 값을 정하기는 어려우나 최대치가 control 값에 비해 오히려 커지는 것을 볼 수 있어, isoprenaline이 교환전류의 회복을 빠르게 하는 것을 알 수 있었다.

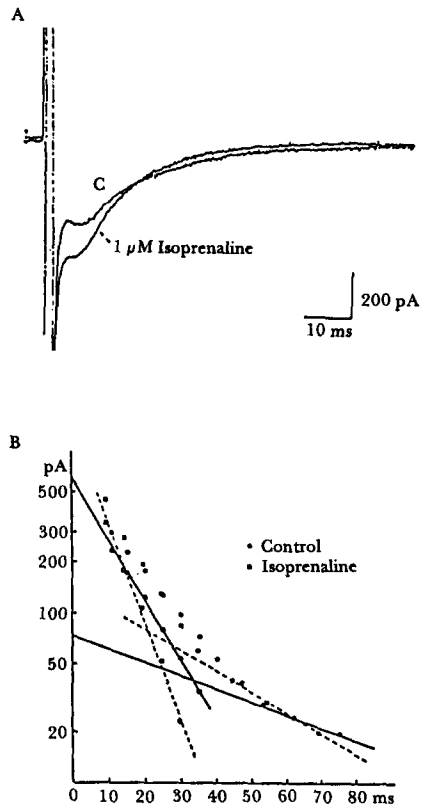


Fig. 11. The effect of $1 \mu\text{M}$ isoprenaline on the Na-Ca exchange current. A) The current recordings were superimposed before (C) and after application of $1 \mu\text{M}$ isoprenaline. B) The current relaxations in A are plotted by the same methods in Fig. 1C.

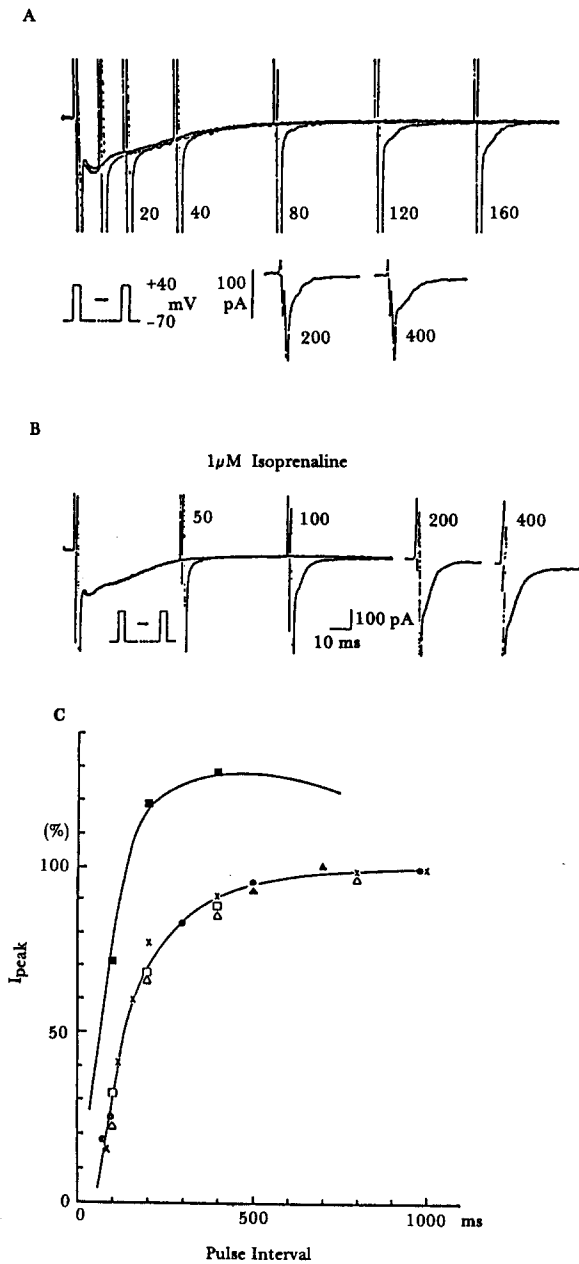


Fig. 12. The effect of isoprenaline on the recovery of Na-Ca exchange current. A) Control. B) Comparing to the results of A, the recovery of I_{peak} was accelerated by $1 \mu\text{M}$ isoprenaline. C) Filled square indicates the isoprenaline and the lower curve is the same as that in Fig. 3B.

본 실험에서의 기록은 6-12 ms 후에 최고치에 도달하는 활성화과정과 그에 이어 자발적으로 감소하는 일과성인 양상으로 나타나고 그 시간 경과도 매우 빠르다. (시정수: 10~18 ms) 이러한 차이를 설명할 수 있는 두가지 가능성을 제시한다면, 첫째는 pulse protocol의 차이이다. 토끼 심방근에서도 5 ms 이상의 긴 pulse를 주는 경우에는 활성화 과정(activation)은 볼 수 없고 tail로만 나타난다⁶⁾. 그러나 이는 시간경과의 차이를 설명해 주지는 못한다. 둘째로는 ryanodine에 의한 영향의 차이에서 그 근거를 찾을 수 있을 것으로 생각된다. guinea-pig에서의 tail current는 ryanodine에 의해 거의 영향을 받지 않는 반면 토끼 심방근에서는 거의 완전히 억제되는데, 이는 토끼의 심방근이 세포내 Ca transient를 이루는 데 있어서 그만큼 근장그물의 기능이 우선적으로 작용하기 때문으로 해석할 수 있다. 따라서 내향전류 감소의 빠른 성분은 근장그물의 재흡수로 인한 세포내 Ca 농도의 감소를 반영한다고 볼 수 있다.

본 실험에서 느린 감소를 보이는 부분(slow component)은 대개 10-30 pA로 그 크기는 작았으나 여러 조건에 의해 별 영향을 받지 않는 특성이 있었다. 그리고 그 크기 및 시간 경과가 Campbell등²⁾이 개구리 심방근에서 기록한 Na-Ca 교환전류의 slow tail과 유사하였는데 Campbell등은 이 전류가 세포내 Ca buffer(calmodulin과 troponin)의 특성에 의함을 이론적으로 구명하였고, Hodgkin등¹³⁾도 salamander rod cell에서 기록한 Na-Ca 교환전류의 느린 성분이 세포내 Ca buffer와의 binding을 반영한다고 주장하였다.

내향전류의 최대치도 다른 연구자들의 기록과 많은 차이를 나타낸다. Fedida등은 guinea-pig 심실근에서 Ca-전류의 최대치의 10-20% 내외라고 하였고⁸⁾, Campbell등은 개구리 심방근에서 20 pA였던데²⁾ 비해 본 연구에서 기록된 250-400 pA의 크기는 매우 큰 것이다. 토끼 심방근에서의 Ca-전류의 최대치가 300-500 pA를 넘지 않음을 고려할 때 2 ms의 저분극 pulse 동안 유입된 Ca만으로는 이 엄청난 크기의 전류를 활성화시킬 Ca transient가 생기는 것이 불가능하며 대부분이 근장그물에서 유리되는 Ca에 의함을 뜻한다고 하겠다.

— 회복과정의 의미 및 기전 —

자극의 빈도와 수축의 변화(positive staircase 및 negative staircase현상)와의 관계를 규명하기 위하여 많은 실험들^{1, 5, 31, 33, 34)}이 행해졌고, 활동전압의 변화

와의 상관관계를 찾았으므로 그 기전을 규명해 보고자 하였으나 조직에 따라 그 현상 자체도 차이가 많았고 명확한 답을 얻을 수 없었다. Fedida 등은 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 밝혔다⁸¹. 그에 반해 Ca-전류의 회복경과는 수축의 회복경과와는 차이가 있었으므로 수축의 크기가 Ca-전류의 크기에 비례하여 결정되는 것은 아니며 또한 자극간격에 따른 Ca-전류의 변화가 수축크기 변화의 직접원인은 아니라고 생각된다. 자극간격에 따른 수축크기의 변화의 기전을 밝히기 위하여 Hilgemann은 세포의 Ca transient를 측정하여 수축과정에서 세포내로 이동하는 Ca량과, 세포밖으로의 배출량, 그 차이로 추정되는 세포내 저장량을 계산하였다^{11,12}). 그 결과 짧은 간격의 premature beat에서는 근장그물이 비활성화(inactivation)로부터 회복이 안 된 상태에 있어 더 이상의 Ca를 유리하지 못함으로써 수축이 감소하며, 휴식 후 수축의 negative staircase는 Ca 배출량이 유입량보다 많아 세포내 저장량이 감소하여 일어나는 것으로 설명하였다. 그러나 연속된 자극에 의해 positive staircase가 나타나는 기전을 설명할 수 있는 것은 아니었다. 본 실험에서는 paired pulse를 주어 회복과정(recovery)을 관찰하였는데, 전류의 활성화 과정과 감소하는 과정이 서로 다른 양상으로 회복되는 것으로 나타났다. 이는 이 두 과정이 서로 다른 기전에 의해 이루어지며 자극 간격 변화에 따른 반응 또한 서로 다를 수 있다고 생각된다. 이에 관한 적절한 해석으로 자극빈도와 수축의 관계를 설명해 보고자 한다. 본 실험의 결과 Na-Ca 교환전류는 자극 간격이 짧을수록 빨리 활성화되어 최대치에 도달하였고(Fig. 3A), 최대전류의 크기도 비교적 빨리 회복되어 시정수 140 ms이었고 800 ms경이면 거의 control값(30sec간격의 자극 일 때의 값)에 도달하였다(Fig. 3B) 이는 Ca-전류의 회복과정의 시정수와 유사한 값으로 활성화 과정이 근장그물에서의 Ca 유리에 의해 일어난다고 가정할 때(근장그물의 Ca 유리기능은 충분히 빠르게 회복될 수 있고) 도리어 자극간격이 짧을수록 유리속도가 빨라질 수 있음을 뜻한다고 생각된다. 이런 결과는 Fedida 등의 실험에서 slow tail의 회복에 수식초가 소요되는 것⁸과는 큰 차이를 보이는 것이나 이는 앞에서도 말했듯이 결과적인 것으로 어떤 기전을 제시하지는 못

한다 하겠다. 도리어 심근은 자극빈도가 빠를수록 큰 수축을 보일 수 있음을 볼 때 근장그물의 Ca 유리기능은 매우 빨리 회복될 수 있고 빠를수록 강화될 수 있음을 보이는 본 실험의 결과는 심근 수축의 positive staircase 현상의 기전을 적절히 제시하는 것이라 생각된다. 또한 자극 간격에 따른 내향전류 감소의 시간경과의 변화(Fig. 5)는 자극간격이 길어질수록 거의 일치함수적으로 느려지는 것으로 나타났다. 이를 자극 빈도가 빠를수록 근장그물의 Ca 재흡수가 빨라짐을 나타낸다고 해석한다면 빠른빈도의 자극에서는 재흡수가 빨라지며 Na-Ca 교환전류로 배출되는 Ca량은 줄어들므로 세포내 Ca저장량이 증가됨을 보이는 것이라 생각된다. 이 또한 positive staircase의 기전을 제시할 수 있는 결과이다. 동시에 휴식 후의 자극에서는 근장그물의 재흡수 속도가 늦어서 Ca transient가 오래 지속되고, 따라서 Na-Ca 교환기전으로 많은 양의 Ca이 배출되어 세포내 Ca저장량은 감소되므로 그 다음의 자극에선 수축의 크기가 감소되는 negative staircase 현상이 나타날 것도 설명할 수 있다. 이러한 결과는 본 실험에서의 기록이 근장그물의 역동적 기능을 그대로 반영하기 때문에 얻을 수 있었던 것으로 앞으로도 근장그물의 기능을 연구하는데 한가지 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

— Bay K, c-AMP, isoprenaline(isoproterenol)의 효과 비교 —

Earm⁶¹의 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 생각된다. Cannell등³¹은 쥐의 심실근에서 Ca-sensitive dye로 calcium transient를 측정하며 막전압과의 관계를 관찰한 실험에서 Earm 등의 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 Isenberg등¹⁶¹이 prepulse의 길이와 수축의 크기와 관계를 실험한 결과와도 잘 일치하며 Fabiato⁷¹가

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 peak activation이 증가하는 결과에서도 볼 수 있다. Bay K에서와 같이 단순히 Ca transient만 증가될 때는 감소하는 시간 경과에는 다소 느려지는 것으로 나타나는데 Hodgkin등¹³⁾이 salamander rod cell에서 관찰한 Ca load와 교환전류의 시간경과와의 관계도 이와 유사하다.

이와 반대로 isoprenaline은 내향 전류감소의 시간 경과를 빠르게 한다(Fig. 11). isoprenaline의 이러한 효과는 Fedida등이 guinea-pig 심실근에서도 기록하였고⁸⁾, adrenaline이 세포내 Ca를 빨리 격리(sequestration)하여 수축의 속도를 빠르게 한다는 실험적 근거들이 많다²⁸⁾. 그러나 isoprenaline의 이러한 작용은 c-AMP를 통하여 근장그물막(SR membrane)의 phospholamban을 phosphorylation시켜 일어나리라고 생각되고 있는데¹⁰⁾, 본 실험에서 isoprenaline의 효과와 c-AMP의 효과가 다르게 나타남은 의외의 결과로 아직 규명되어야 할 것이 많음을 시사한다.

Fig. 12에서 isoprenaline이 회복을 촉진하는 작용은 isoprenaline에 의해 수축의 repriming이 빨라진다는 보고와도 잘 일치하는 것으로 isoprenaline의 positive inotropy기전의 여러 측면을 보여준다 하겠다.

VI. 결 론

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

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

2. 최고값에 이른 후 내향전류는 점차 감소하였는데 감소의 시간 경과에는 빠른 부분과 느린 부분의 두 부분으로 나눌 수 있었고 그 시정수는 각각 10~18 ms와 60~140 ms였다.

3. 여러 간격의 paired pulse를 30초 간격으로 계속 자극하는 사이사이에 주며 내향전류의 회복을 관찰하

였다. 내향전류의 최대치는 자극간격이 길어짐에 따라 지수함수적으로 회복되었고 그 시정수는 140 ms였으며 1 μ M의 isoprenaline 투여 및 세포내외의 c-AMP 투여에 의하여 증가하였다.

6. 내향전류의 감소의 빠른 성분의 시정수는 5 μ M Bay K, c-AMP에 의해 느려졌으며 isoprenaline에 의하여 짧아졌다. 그러나 느린 성분은 큰 영향을 받지 않았다.

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

REFERENCES

1. Boyett MR and Fedida D. *Change in the electrical activity of day cardiac Purkinje fibers at high heart rates.* *J Physiol* 1984, 350:361-391.
2. Campbell DL, Giles WR, Robinson K and Shibata EF. *Studies of the sodium-calcium exchanger in bull-frog atrial myocytes.* *J Physiol.* 1988, 403:317-340.
3. Cannell MB, Berlin JR and Lederer WJ. *Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells.* *Science.* 1987, 238:1419-1423.
4. Caroni P and Carafoli E. *The Ca-pumping ATPase of heart sarcolemma.* *J Biol chem.* 1981, 256:3263-3270.
5. Chapman RA and Niedergerke R. *Interaction between heart rate and calcium concentration in the control of contractile strength of the frog heart.* *J Physiol.* 1970, 211:423-443.
6. Earm YE, Ho WK and So IS. *An inward current activated during late low-level plateau phase of the action potential in rabbit atrial cells.* *J Physiol.* 1989, 410:64P.
7. Fabiato A. *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.* 1985, 85:291-320.
8. Fedida D, Noble D, Shimoni Y and Spindler AJ.

- Inward current related to contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 1987, 385:565-589.
9. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflüger Archiv.* 1981, 395:6-18.
 10. Hayes JS. Coordination of cardiac contractility and metabolism by protein phosphorylation. In *protein phosphorylation in heart muscle*. ed. by Solaro RJ. pp 17-54 CRC Press, 1986.
 11. Hilgemann DW. Extracellular calcium transients and action potential configuration changes related to post-stimulatory potentiation in rabbit strium. *J Gen Physiol.* 1986, 87:675-706.
 12. Hilgemann DW and Noble D. Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transients in rabbit atrium: Reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc Royal Soc.* 1987, B230:163-205.
 13. Hodgkin AL, Mconoughton PA and Nunn BS. Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rod. *J Physiol.* 1987, 391:347-370.
 14. Hume JR and Uehara A. Properties of 'creep currents' in the single frog atrial cells. *J Gen Physiol.* 1986, 87:833-857.
 15. Hume JR and Uehara A. 'Creep currents' in single frog atrial cells may be generated by electrogenic Na-Ca exchange. *J Gen Physiol.* 1986, 87:857-885.
 16. Isenberg D, Klockner U, Mascher D and Ravens U. Changes in contractility and membrane currents as studied with a single patch-electrod whole cell/clamp technique with a single cardiac cells. In: *Electrophysiology of Single Cardiac Cells* pp 25-28. ed. by Noble D and Powell T. Academic Press. 1987.
 17. Kimura J, Miyamae S and Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol.* 1987, 384:199-222.
 18. Kimura J, Noma A and Irisawa H. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature.* 1986, 319:596-597.
 19. Langer GA. Sodium-calcium exchange in the heart. *Ann Rev Physiol.* 1982, 44:435-449.
 20. Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG and Watanabe AM. β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca-ATPase activity in guinea-pig ventricle. *J Biol Chem.* 1983, 258:464-471.
 21. Lüttgau H and Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J Physiol.* 1958, 143:486-505.
 22. Mechmann S and Pott L. Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature.* 1986, 319:597-599.
 23. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW. Strontium nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle. *Brit J Pharmacol.* 1984a, 81:551-556.
 24. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW. 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.* 1984b, 81:543-550.
 25. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW. Electrical activity and contraction in cells isolated from rat and guinea-pig ventricular muscle: a comparative study. *J Physiol.* 1987a, 391:527-544.
 26. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW. Calcium-activated inward current and contraction in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 1987b, 391:545-560.
 27. Mullins LJ. *Ion transport in Heart.* Raven Press: New York. 1981.
 28. Nathan D and Beeler GW. Electrophysiological correlates of the inotropic effects of isoprenaline in canine myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1975, 7:1.
 29. Philipson KD. Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicle. *Ann Rev Physiol* 1985, 47:561-571.
 30. Reuter M and Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol.* 1968, 195:451-470.
 31. Rosin H and Farah A. Post-stimulation potentiation of contractility in the isolated auricle of rabbit. *Am J Physiol.* 1955, 180:75-82.
 32. Trautwein W and Kaneyama M. The mechanism of β -adrenergic regulation of calcium channels: intracellular injections and patch-clamp studies. In: *Electrophysiology of Single Cardiac Cells*, pp 105-

103. ed. by Noble D and Powell T. Academic Press, 1987.
33. Wohlfart B. Relationships between peak force action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. *Acta Physiol Scand.* 1979, 106:395-409.
34. Woodworth RS. Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause, of the heart. *Am J Physiol.* 1902, 8:213-249.
-