

기니픽 심근의 수축력과 세포내 Na^+ 활성도에 미치는 α_1 -Adrenergic 수용체 자극효과[#]

전북대학교 수의과대학, 심혈관 연구소*, 포항공과대학교 생명공학과**

김진상 · 강형섭 · 채수완* · 이진옥**

= Abstract =

Effects of α_1 -Adrenergic Stimulation on Contractility and Intracellular Na^+ Activity of Guinea Pig Ventricular Muscles[#]

Jin-Sang Kim, Hyung-Sub Kang, Soo-Wan Chae* and Chin-Ok Lee**

College of Veterinary Medicine,

**Institute of Cardiovascular Research, Chonbuk National University*

***Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology*

Myocardial α_1 -adrenoceptors have been shown to mediate a biphasic inotropic response that was characterized by a transient decline followed by a sustained increasing phase in guinea pig ventricular muscle. Recently one group reported that an α_1 -adrenoceptors-induced intracellular Na^+ decrease is linked to fast Na^+ channel inhibition and another group reported that it is linked to Na^+ - K^+ pump activation by α_{1b} -adrenoceptors. But until now, its mechanism is not clear. Therefore, to see whether the Na^+ channel or Na^+ - K^+ pump is related to a decrease in intracellular Na^+ activity and/or the negative inotropic response, and which α_1 -adrenoceptor subtype was involved in the decrease in intracellular Na^+ activity by phenylephrine, we used conventional and sodium selective microelectrodes, and tension transducer to determine the effects of α_1 -adrenergic stimulation on membrane potential, intracellular Na^+ activity, and twitch force in guinea pig ventricular muscles. 10^{-5} M Phenylephrine produced a slight hyperpolarization of the diastolic membrane potential, a decrease or increase in a_{Na^+} , and a biphasic inotropic response. The negative inotropic response accompanied by a decrease in intracellular Na^+ activity, whereas in muscles showing a remarkable positive inotropic response without initial negative inotropic effect was accompanied by an increase in intracellular Na^+ activity. The decrease in intracellular Na^+ activity was apparently inhibited by WB4101, an antagonist of the α_{1a} -adrenoceptors. The decrease in intracellular Na^+ activity caused by phenylephrine was not abolished or reduced by a block of the fast Na^+ channels. V_{max} also was not affected by phenylephrine. Phenylephrine produced an increase in intracellular Na^+ activity in the presence of a high concentration of extracellular

[#] 본 연구는 1995년도 한국과학재단의 핵심전문과제 연구비(951-0711-037-1) 지원으로 수행되었음.

Ca²⁺(in quiescent muscle) or phorbol dibutyrate, a protein kinase C activator(in beating muscle). These suggest that the α_{1a} -adrenoceptors-mediated decrease in intracellular Na⁺ activity may be related to the protein kinase C.

Key Words: α_1 -Adrenoceptor, WB4101, Intracellular sodium activity, Twitch force, Phenylephrine, Heart

서 론

α_1 -Adrenoceptors(α_1 -ARs) 자극시 second messenger인 inositol-1,4,5-triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)가 활성화되어(Otani등, 1988; Scholz등, 1988) 심근 수축력에 대한 효과를 나타낸다. 즉, 흰쥐 심근에서는 초기 일시적인 수축력 증가에 이어 일시적인 감소가 나타난 다음 지속적인 수축력 증가를 일으키는 3단계의 수축력 변동(Otani등, 1988; Toshe등, 1987; Ertl등, 1991)이 있는 반면, 기니픽 심근에서는 초기 일시적 수축력 감소에 이어서 지속적인 증가를 보이는 2단계 수축현상을 나타낸다(Chae등, 1995). 이러한 효과들 중 수축력 증가기전으로는 첫째, IP₃를 경유한 세포내 Ca²⁺ 저장소로부터 Ca²⁺의 유리증가(Steinberg등, 1989; Eckel등, 1991), 둘째, DAG를 경유한 protein kinase C(PKC) 활성화로 Ca²⁺ 통로 활성화(Otani등, 1988; Endoh, 1991), Na⁺-H⁺ 교환기 활성화(Otani등, 1990; Iwakura등, 1990; Gambassi등, 1992), Na⁺-Ca²⁺ 교환기 활성화 및 Ca²⁺ current 증가(Jahnel등, 1992), 셋째, α_1 -ARs 자극으로 인한 delayed rectifier K⁺ current 감소에 의한 활동전위 기간연장(Fedida 및 Bouchard, 1992), 및 세포내 alkalinization(pH_i 증가)에 의한 myofilament의 감응도 증가(Endoh 및 Blinks, 1988) 등이 보고되었다. 특히, 많은 연구자들은 α_1 -ARs 자극에 의한 일시적 수축력 증가를 Na⁺-H⁺ 교환기 활성화로 Na⁺이 증가되면 Na⁺-Ca²⁺ 교환기가 활성화되어 세포내 Ca²⁺의 증가에 의한다고 하였지만 α_1 -ARs 자극시 세포내 Na⁺ 활성화(a_{Na^+})를 측정하지 못했다. 심근에서 Na⁺-H⁺ 교환기가 활성화되면 세포내 pH(pH_i)와

a_{Na^+} 의 증가가 관찰되어야 하는데 이전 연구자들은 pH_i 증가효과만을 관찰하였을 뿐(Iwakura등, 1990; Terzic등, 1992), 동시에 a_{Na^+} 변동에 대해서는 언급하지 못하였고, 오히려 α_1 -ARs 자극시 a_{Na^+} 가 감소(Chae등, 1995)되기 때문에 Na⁺-H⁺ 교환기를 활성화시킨다는 직접적인 증거를 제시하지 못하였다. 최근 저자 등은 기니픽 유두근에서 a_{Na^+} 가 감소되어 Na⁺-H⁺ 교환기의 활성을 의심하였으나 갑상선 기능항진증 기니픽 심근에서는 a_{Na^+} 의 증가를 관찰하였고, 역시 정상과 갑상선 기능항진증 기니픽 심근에서 모두 pH_i의 증가를 관찰하여 α_1 -ARs 자극에 의한 수축력 증가기전은 a_{Na^+} 와 pH_i 증가를 일으키는 Na⁺-H⁺ 교환기의 활성화에 의한 결과임을 보고하였다(Kim등, 1995). 그러나 이러한 증가기전에 비하여 α_1 -ARs 자극시 나타나는 수축력 감소기전은 물론 수축력 변동과 a_{Na^+} 와의 관계에 대한 연구는 아직 미흡하다.

α_1 -ARs 자극시 나타나는 a_{Na^+} 감소효과는 심장의 negative chronotropic 효과와 밀접한 관련이 있기 때문에(Zaza등, 1990) 수축력 증가기전 만큼 감소기전도 중요하지만 이에 대한 연구는 많지 않다. Chae등(1995)은 기니픽 심근에서 a_{Na^+} 감소가 초기 수축력 감소와 밀접한 관련이 있고 이러한 a_{Na^+} 감소가 fast sodium 통로 차단제인 tetrodotoxin(TTX)으로 차단됨을 관찰하여 α_1 -ARs 자극시 a_{Na^+} 감소는 TTX-sensitive Na⁺ 통로를 경유한 Na⁺ 유입이 감소되기 때문이라고 하였다. 그 외에 수축력 감소기전으로 Zaza등(1990)은 개의 Purkinje 섬유에서 a_{Na^+} 감소와 automaticity 감소가 Na⁺-K⁺ pump를 자극한 결과라고 하였다. 또한 흰쥐 심근에서도 phenylephrine(PE)에 의한 과분극이 Na⁺-K⁺ pump 활성화의 결과임을 보였다(Ertl등, 1991). 따라서 이들 결과에 의하면 a_{Na^+}

감소는 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump 활성화에 의하며 이 Na^+ 감소가 수축력 감소와 밀접하게 관련되어 있음을 암시하였다. 그리고 Williamson등(1993)도 흰쥐 심근세포에서 PE에 의한 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump current 증가를 보고하였는데 이 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump current 증가효과가 $\alpha_1\text{-ARs}$ subtype 중 $\alpha_{1b}\text{-ARs}$ 를 경유한 결과임을 보였고 역시 CEC-sensitive adrenoceptor subtype을 경유하여 심장의 automaticity가 감소하며 $\alpha_{1b}\text{-ARs}$ 자극으로 a_{Na}^i 가 감소하는데 이는 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump 활성화와 밀접하게 관련되어 있음을 언급하였다(Del Balzo등, 1990).

이와같이 $\alpha_1\text{-ARs}$ 자극에 의한 수축력 증가와 감소효과는 분명히 다른기전에 의하여 일어나는데 아직까지 감소기전은 불명확한 바 본 연구에서는 PE에 의한 기니픽 심근에서 $\alpha_1\text{-ARs}$ 자극시 수축력 변동, a_{Na}^i 변동 등을 관찰한 결과 이전 연구보고들과 매우 상반되어 심장에 대한 $\alpha_{1a}\text{-ARs}$ 의 연구에 새로운 방향으로 지적될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1) 유두근 적출, 및 세포내 이온농도, 수축력과 막전위의 측정

체중 250 g 내외의 건강한 기니픽을 두부타격으로 치사시킨 후 경동맥을 절개하여 방혈시킨 즉시 심장을 적출하여 산소로 포화(97% O_2 , 3% CO_2)된 Tyrode 용액(pH 7.3~7.4, 36~37°C, 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.05 MgCl_2 , 0.45 NaH_2PO_4 , 11.9 NaHCO_3 , 1.8 CaCl_2 , 및 5 mM dextrose)에 넣어 혈액을 제거하였다. 수술현미경하에서 우심실로부터 직경이 약 0.5~1 mm, 길이가 약 2~3 mm의 유두근을 적출하여 tissue chamber에 넣고 유두근의 한쪽 끝을 sylgard 바닥에 핀으로 고정하고 전기자극은 핀 옆에 가까이에서 하였다. 다른핀은 수축시 근육의 유동을 감소시키는데 이용하였다. 근육의 다른 한쪽은 25 μm 의 은선을 이용하여 장력 transducer에 연결하였다. 산소로 포화된 Tyrode 용액이 관을 통해 일정속도(5 ml/min)로 공급되고 관류속도는 근육주위의 용액이 수초내에

다른 이온농도 또는 약물을 포함한 시험용액으로 변동될 수 있도록 조정하였다. 전기자극은 1 Hz로 실시하면서 chamber 통로를 통해 산소가 포화된 Tyrode 용액을 관류시켰다. 수축력이 일정해지면 3 M KCl이 채워진 일반 미세전극을 세포내에 삽입하여 막전위를 측정하고 이 막전위가 일정해지면 Na^+ 에 선택적으로 작용하는 Simon's neutral carrier ETH 227(Fluka Chemical, Huppuge, N. Y.)로 만들어진 Na^+ 선택적 미세전극을 일반전극 가까이에 삽입하여 막전위와 a_{Na}^i 를 측정하였다. 심실근의 자극은 자극기로부터 자극 유리장치를 통한 후 사각파로 시행하였다. 자극전압은 역치 전압보다 20~40% 높게 하고, 수축력은 1 Hz로 자극하면서 장력 transducer를 이용하여 측정하였다.

Transducer의 출력은 chart recorder와 오실로스코프에 연결하여 chart recorder에 계속적으로 기록되고 오실로스코프에 나타나게 하였다. 장력 transducer는 50 mV/mg의 감도까지 linear하여 미세한 장력의 변동도 측정할 수 있다(Im 및 Lee, 1984; Lee 및 Dagostino, 1982). a_{Na}^i 기록은 이온 선택적 미세전극의 전압과 세포막전위의 동시 측정에 의해서 얻어졌다. 세포막전위를 일반전극으로 측정하여 이온 선택적 미세전극을 이용하여 측정된 세포내 전위에서 빼것이다. 출력은 또한 Vm을 측정하기 위해 0.2~0.03 Hz의 저주파 필터를 거쳤다(Im 및 Lee, 1984). 만들어진 Na^+ 선택적인 미세전극은 100 mM KCl, 1, 10 및 100 mM NaCl 용액에서 각각 실험 전 계측하여 반응곡선이 유효한 전극을 사용하고 실험후 역시 계측하여 a_{Na}^i 를 산출하였다.

2) 이용기기 및 사용약물

이용 기기는 전기자극기(Model 305-R, WPI), 전기자극 조절기(1835-B, WPI), electrometer(FD 223, WPI), microprobe system(KS-700, WPI), recording system(30-V, 3400, Gould), oscilloscope(5113, Tektronix), tension transducer(403A, Cambridge), stereozoom microscope

(Olympus), micromanipulator(Piror, WPI), vibration isolation table(Harvard), circulator(Jeio Tech Co.), peristaltic pump(Vision), pipette puller(David Kopf) 및 microscope(Nikon) 등이었다.

사용약물은 phenylephrine, atenolol, WB4101 (N-[2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethyl]-2,3-dihydro-1, 4-benzodioxin-2-methanamine), CEC(chloroethylclonidine 2HCl), lidocaine, tetrodotoxin, 및 phorbol dibutyrate(이상 Sigma), EIPA(RBI) 등이었다.

결 과

1) 기니픽 심근의 막전위, a_{Na^+} 및 수축력에 미치는 PE의 영향

Fig. 1의 panel A, B와 C는 1 Hz로 자극하는 심근에서 10^{-5} M PE에 의한 a_{Na^+} 의 감소에(panel left)와 증가에(panel right) 그리고 수축력 감소와 수축력 증가예를 보여 주고 있다. 심근에서 PE에 의한 α_1 -ARs 자극은 대부분의 경우(43개의

실험 유두근 중 37개, 86%)는 panel left 처럼 a_{Na^+} 감소를 일으켰지만 몇몇 유두근(43개의 실험 유두근 중 6개, 14%)에서는 panel right 처럼 a_{Na^+} 를 증가시켰다. 그러나 a_{Na^+} 감소의 경우에는 수축력의 일시적 감소가 병행되었고 a_{Na^+} 이 증가하는 경우의 수축력은 일시적 감소없이 지속적인 수축력 증가 현상만 보였다. 그리고 panel D는 PE에 의한 수축력 변화와 a_{Na^+} 의 변동과의 관계를 그래픽한 그림으로, 초기 일시적 수축력 감소 백분율과 a_{Na^+} 의 감소와의 회귀성(regression)은 없었으나 PE에 의해 a_{Na^+} 이 증가하는 경우에는 수축력 증가 백분율과 밀접한 관계가 있음을 보였다. 또한 모든 심근에서 a_{Na^+} 증가나 감소, 또는 수축력의 증가나 감소에 관련없이 과분극(1.8 ± 0.05 mV)이 일어남을 관찰하였다. 따라서 수축력 변동은 a_{Na^+} 의 변동과 밀접한 관계가 있음을 의미한다.

2) WB4101 존재하에서 기니픽 심근의 막전위, a_{Na^+} 및 수축력에 미치는 PE의 영향

α_1 -ARs subtype 중 어떠한 수용체가 a_{Na^+} 감소

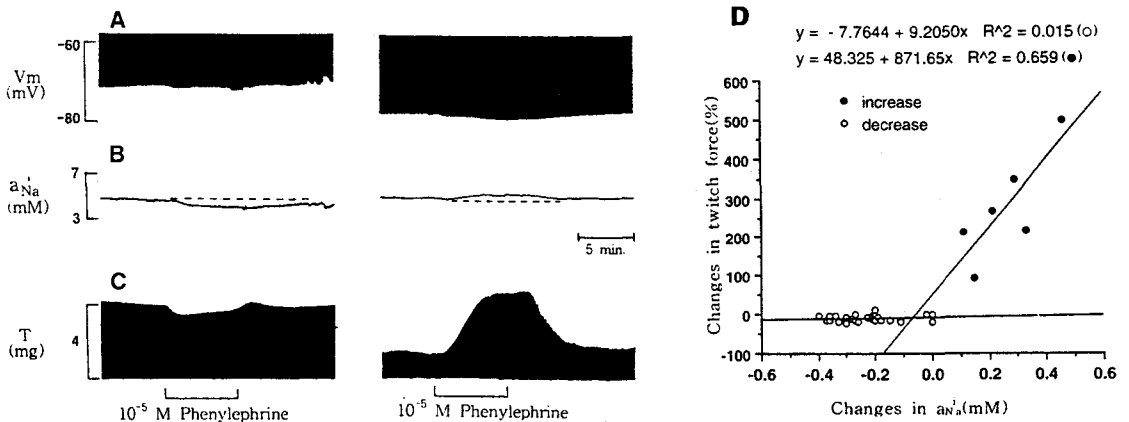


Fig. 1. Recordings showing effects of phenylephrine on diastolic membrane potential, V_m (A), intracellular Na^+ activity, a_{Na^+} (B), and twitch force, T(C), in guinea pig papillary muscles. Panel A, B, and C; record of V_m , a_{Na^+} , and T respectively. This figure represents a case of decrease(panel left) and increase(panel right) in a_{Na^+} . Plots(D) showing relation between changes in twitch force and a_{Na^+} induced by phenylephrine in spontaneously beating muscles. Filled circles(●) are cases which a_{Na^+} and twitch force increased by phenylephrine were fitted by the regression line. Open circles(○) are those muscles in cases which a_{Na^+} and twitch force decreased.

와 관련되는가를 관찰하기 위하여 α_{1A} -ARs 선택적 길항제인 WB4101 존재하에서 PE의 효과를 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 WB4101 존재하지 않은 상태에서는 10^{-5} M PE에 의하여 막전위의 과분극과 현저한 a_{Na}^i 의 감소가 나타났고 일시적인 수축력 감소에 이어서 증가가 나타났다 (panel left). 그러나 3×10^{-7} M WB4101 존재하에서는 PE에 의하여 막전위와 a_{Na}^i 감소현상이 전혀 나타나지 않았고, 초기 수축력 감소 및 증가효과도 WB4101에 의해 완전히 차단되었다(panel right).

3) Tetrodotoxin 또는 lidocaine 존재하에서 박동심근의 막전위, a_{Na}^i 및 수축력에 미치는 PE의 영향과, 활동전위 및 V_{max} 에 미치는 PE의 영향

α_1 -ARs 자극에 의한 a_{Na}^i 의 감소가 fast sodium 통로를 경유한 Na^+ 유입감소에 의한 결과인지를 관찰하기 위하여 tetrodotoxin(TTX)과 lidocaine 존재하에서 PE의 효과를 관찰하였다. TTX가 존재하지 않은 상태의 대조에서는 PE에 의하여 과분극과 a_{Na}^i 의 감소효과가 나타났고 일시적인 수축력 감소없이 증가만을 나타냈다. 10^{-5} M TTX와 3×10^{-4} M lidocaine은 a_{Na}^i 를 현저히 감소시켰으

며, 역시 TTX 존재하에서도 PE에 의해 막전위의 과분극, a_{Na}^i 의 감소 및 수축력 증가를 일으켰다 (Fig. 3). 이러한 효과를 명백히 하기 위하여 또 다른 fast sodium 통로 차단제인 3×10^{-4} M lidocaine을 전처리한 후 PE의 영향(Fig. 4)을 관찰한 결과 대조실험과 비슷하게 막전위의 과분극과 a_{Na}^i 의 감소를 나타냈고 수축력 증가효과는 lidocaine에 의해 차단되었다(Fig. 4). 또한 PE에 의한 a_{Na}^i 의 감소효과가 fast sodium channel을 경유하는가를 보다 확실하게 하고자 V_{max} 를 측정된 결과, V_{max} 는 PE 투여 후 273 ± 7 V/sec로 대조실험의 272 ± 7 V/sec와 유사하였고(Fig. 5) 활동전위 기간은 PE에 의해서 단축되거나 연장되는 이중효과를 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 α_1 -ARs 자극에 의한 a_{Na}^i 감소와 수축력 감소가 Na^+ 통로를 경유한 Na^+ 의 유입억제에 의한 결과가 아닌 것으로 관찰되었다.

4) 고농도 Ca^{2+} 존재하에서 막전위와 a_{Na}^i 에 미치는 PE의 영향

Fig. 1에서 PE에 의한 a_{Na}^i 의 변동이 수축력 변동과 상호 밀접한 관계가 있음을 보았다. 따라서 Ca^{2+} 에 의한 영향을 관찰하기 위하여 세포외 측, ECF내 고농도 Ca^{2+} 을 처리하여 a_{Na}^i 을 감소시킨

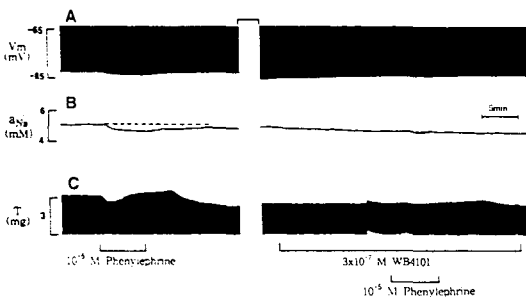


Fig. 2. Recordings showing effects of phenylephrine on V_m , a_{Na}^i , and T in the absence (panel left) and presence (panel right) of WB4101, an antagonist of α_{1A} -adrenoceptor. Guinea pig papillary muscle was driven at 1 Hz. One experiment typical of five is shown.

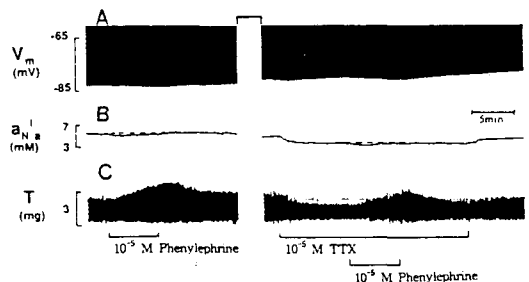


Fig. 3. Recordings showing effects of phenylephrine on V_m , a_{Na}^i , and T in the absence (panel left) and presence (panel right) of 10^{-5} M tetrodotoxin (TTX), a fast Na^+ channel blocker. One experiment typical of three is shown.

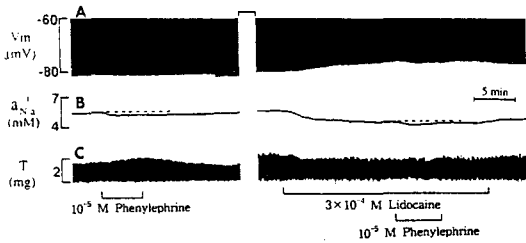


Fig. 4. Recordings showing effects of phenylephrine on V_m , a_{Na} , and T in the absence (panel left) and presence (panel right) of lidocaine, a fast Na^+ channel blocker. One experiment typical of three is shown.

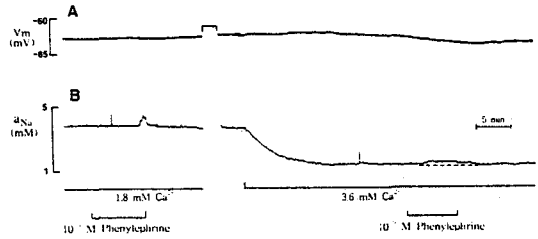


Fig. 6. Recordings showing effects of phenylephrine on V_m , a_{Na} , and T in quiescent (0 Hz) papillary muscle. Panel right shows effects of phenylephrine on V_m and a_{Na} in the presence of high Ca^{2+} concentration. One experiment typical of four is shown.

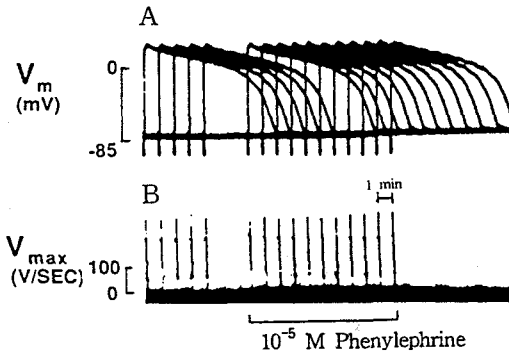


Fig. 5. Effects of phenylephrine on action potential (A) and V_{max} (B) in guinea pig papillary muscle. Action potential and V_{max} were recorded at 1-min intervals. V_{max} was differentiated by differentiator. One experiment typical of three is shown.

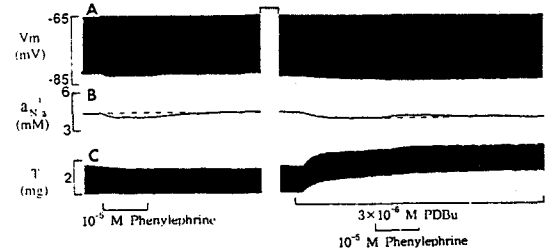


Fig. 7. Recordings showing effects of phenylephrine on V_m , a_{Na} , and T in the absence (panel left) and presence (panel right) of phorbol dibutyrate (PDBu), a PKC activator. One experiment typical of three is shown.

후 PE의 영향을 관찰하였다(Fig. 6). 그림 6의 panel left처럼 정지심근에서 PE에 의한 a_{Na} 변동이 나타나지 않아 자극빈도에 의존적임을 알 수 있었다. 3.6 mM Ca^{2+} 을 처리한 결과 현저한 a_{Na} 의 감소가 나타났고 이러한 a_{Na} 감소상태에서 10⁻⁵ M PE를 투여한 결과 a_{Na} 의 증가가 나타났다(Fig. 9). 그리고 대조실험에서(panel left) PE에 의한 과분극은 나타나지 않았고 고농도 Ca^{2+} 처리로 막전위에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 고농도

Ca^{2+} 존재하에서는 a_{Na} 증가와 과분극이 뚜렷하게 관찰되었다. 이는 ECF내 고농도 Ca^{2+} 존재하에서는 α_1 -ARs 자극에 의해 a_{Na} 이 증가될 수 있음을 의미한다.

5) Phorbol dibutyrate(PDBu) 존재하에서 심근의 막전위, a_{Na} 및 수축력에 미치는 PE의 영향

PE에 의한 과분극, a_{Na} 감소 및 수축력의 변동이 PKC를 경유한 효과인지를 알아보기 위하여 PKC activator로 알려진 PDBu 존재하에서 PE의 효과를 관찰하였다(Fig. 7). 대조실험에서 10⁻⁵

M PE은 과분극을 일으켰고 a_{Na^+} 를 4.2에서 3.8 mM로 약 0.4 mM 감소시켰다. 그리고 3×10^{-5} M PDBu는 a_{Na^+} 를 약 0.35 mM 감소시켰으나, 심장근의 장력을 현저히 증가시켰고 막전위를 과분극시켰다. PDBu 존재하에서 PE는 0.2 mM의 a_{Na^+} 를 증가시켰고 수축력은 PE에 의해 영향받지 않았다.

고 찰

1) α_1 -ARs와 심장 또는 심근의 수축력과의 관계

본 연구의 기니피크 심근에서 PE에 의해 일시적인 초기 수축력 감소와 지속적인 수축력 증가를 보여 흰쥐 심근에서와는 다른 2단계의 수축반응을 보였다. 최근까지 심근에서 α_1 -ARs 자극에 의한 수축력 변동기전에 대한 연구보고 중 수축력 증가 기전으로 Na^+H^+ 교환기의 활성화를 들 수 있다. 이 교환기의 활성화는 세포내 alkalosis를 일으켜 Ca^{2+} 에 대한 myofilament의 반응성이 증가하여 수축력 증가를 나타내기 때문에 심근 수축력 조절에 있어서 심근 pH_i는 필연적 요소로 알려져 있다 (Voughan-Jones 등, 1989). α_1 -ARs 자극에 의한 PKC 활성화로 Na^+H^+ 교환기가 자극되면 alkalinization을 일으키고 Na^+ 의 증가를 추정하여 Na^+Ca^{2+} 교환기에 의한 Ca^{2+} 유입으로 수축력 증가를 일으킨다고 하였다(Otani 등, 1990; Iwakura 등, 1990). 그러나 Iwakura 등(1990)은 심장 세포에서 α_1 -ARs 자극에 의한 pH_i 증가현상이 단지 Na^+H^+ 교환기 억제제인 amiloride로 차단됨을 보였고, Otani 등(1990)은 수축력 증가효과가 amiloride에 의해 차단됨을 관찰하여 Na^+H^+ 교환기를 활성화시킨다고 하였을 뿐 a_{Na^+} 을 직접 측정하지 못함으로써 α_1 -ARs 자극에 의한 Na^+H^+ 교환기의 활성화에 대한 직접적인 증거를 제시하지 못하고 오히려 α_1 -ARs 자극은 a_{Na^+} 의 감소를 보여 (Chae 등, 1995; Zaza 등, 1990) 충분한 설명을 하지 못했다. 본 실험에서도 대부분의 정상 기니피크 심근에서 a_{Na^+} 의 감소가 나타나 Na^+H^+ 교환기

활성에 대해서 의심을 갖게 되었으나 몇몇 기니피크 심근에서 a_{Na^+} 이 증가하였고(Fig. 1) pH_i가 증가하였다. 이 pH_i가 Na^+H^+ 교환기 억제제로 차단되었고(자료미제시), 과감상선 호르몬중 기니피크 심근에서 a_{Na^+} 의 증가를 관찰하여(Kim 등, 1995) Na^+H^+ 교환기의 활성화에 의한 a_{Na^+} 증가 및 pH_i 증가 원인이 될 수 있다. 개의 Purkinje fiber에서도 PE에 의해 a_{Na^+} 가 증가될 수 있음을 보고(Zaza 등, 1987) 한바 있어서 본 연구결과와 일치하였다. 또한 Terzic 등(1991)은 흰쥐의 좌심방에서 PE에 의한 수축력 증가효과가 Na^+H^+ 교환기 활성화의 결과이며 Na^+K^+ pump 억제제 존재하에서 a_{Na^+} 의 증가를 보고한 바 있고 α_1 -ARs 자극에 의한 Na^+H^+ 교환기 활성화로 a_{Na^+} 이 증가되며 이에 대한 대상작용으로 Na^+K^+ pump를 자극하여 a_{Na^+} 을 유출시킨다고 하였다(Terzic 등, 1991). 따라서 α_1 -ARs 자극시 a_{Na^+} 를 증가시킬 수 있는 기전과 감소시킬 수 있는 기전이 공존하고 있음을 추측할 수 있다. 이를 더욱 뒷받침하는 증거로 본 실험에서 PDBu 존재하에서 또는 고농도 Ca^{2+} 존재하에서 a_{Na^+} 이 증가된 것을 제시할 수 있다. 이와 같이 α_1 -ARs 자극시 수축력 증가기전으로 많은 예가 지적되고 있으나 수축력 감소기전에 대해서 아직도 불명확한 점이 많다.

흰쥐나 기니피크에서 PE 투여시 수축력 감소효과가 나타난 후 이어서 수축력 증가 효과가 나타나는데(Chae 등, 1995; Otani 등, 1990) 최근 α_1 -ARs 자극시 나타나는 수축력 증가효과의 중요성 만큼 수축력 감소효과에 대해서도 많은 연구 대상이 되고 있다. 왜냐하면 감소효과는 심장의 negative chronotropic 효과와 밀접한 관련(Zaza 등, 1990)이 있기 때문이다. 수축력 감소를 일으킬 수 있는 기전을 보면 다음과 같다. 세포내 Na^+ 감소는 Na^+Ca^{2+} 교환기를 경유한 세포내 Ca^{2+} 을 저하시킬 수 있다(Vassalle 및 Lee, 1984). 따라서 Chae 등(1995)은 α_1 -ARs 자극시 수축력 감소는 a_{Na^+} 감소와 관련이 있는데 이 a_{Na^+} 감소는 TTX-sensitive Na^+ channels을 경유한 Na^+ 유입의 억제에 의하며 결국 a_{Na^+} 감소가 Na^+Ca^{2+} 교환기를

경유한 Ca^{2+} 을 감소시킴으로 수축력이 감소할 수 있다고 하였다. 반면 이전 연구(Kim 등, 1995)에서는 α_1 -ARs 자극시 지속적인 수축력 증가가 나타나는 과감상선 호르몬증 기니픽 심근에서 a_{N_s} 가 증가되었다. 또한 Fig. 1에서 보는 바와 같이 수축력 변동은 a_{N_s} 변동과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 따라서 a_{N_s} 의 감소기전을 밝히면 초기 수축력 감소기전을 이해 할 수 있음을 고려하여 a_{N_s} 의 감소기전을 밝히는데 중점을 두었다.

2) α_1 -ARs subtype과 a_{N_s} 의 관계

최근 α_1 -ARs의 subtype들이 알려지고 있는데 (Minneman, 1988), Endoh 등(1992)은 radioligand binding assay와 기능적인 연구에 의해 최소한 2개 이상의 subtype이 존재한다고 주장하였다. 그리고, Han 등(1987)과 Minnemann 등(1988)은 약리학적인 측면에서 2가지의 subtype으로 분류하였는데, 즉 WB4101에 의해 경쟁적으로 차단되는 α_{1a} -ARs와 CEC에 의해 경쟁적으로 차단되는 subtype을 α_{1b} -ARs로 분류하였다. WB4101은 α_{1a} -ARs에 작용하여 phosphoinositide의 가수분해를 억제하여 심장의 automaticity 증가를 억제하는 반면 CEC는 α_{1b} -ARs에 작용하여 phosphoinositide 대사에 영향이 없고 심장의 automaticity 감소를 억제시킨다고 하였다(Del Balzo 등, 1990). 따라서 α_{1a} -ARs를 자극하게 되면 세포막의 K^+ conductance를 억제하여 막전위의 탈분극을 일으켜 automaticity를 증가시키는 반면 α_{1b} -ARs 자극은 Na^+ - K^+ pump를 활성화시켜 과분극을 일으킴으로써 automaticity를 감소시킨다(Del Balzo 등, 1990; Anyukhovskiy 등, 1992). 또한 WB4101-과 CEC-sensitive α_1 -adrenoceptor 자극으로 심장에서 수축력 증가효과를 나타내는데(Williamson 등, 1994) Wilson 등(1990)과 Yu 등(1994)은 간세포나 심장근에서 α_{1b} -ARs 활성화로 세포내 Ca^{2+} 의 유입증가로 수축력 증가를 일으킨다고 하였고, α_{1a} -ARs 활성화로 세포내 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시킨다(Yu 및 Han, 1994; Minneman 등, 1988). 이와같이 α_1 -ARs subtype에 따라 효과가

현저히 다름을 알 수 있다. 특히 Williamson 등(1993, 1994a, 및 1994b)은 심근에 대한 α_1 -ARs 자극효과는 α_{1a} - 및 α_{1b} -ARs를 경유하는데, 세포내 Na^+ 감소나 수축력 감소는 CEC에 sensitive한 α_{1b} -ARs를 경유한 Na^+ - K^+ pump 활성화로 유발된다고 주장하였다. 역시 Zaza 등(1987), Ertl 등(1991) 및 Terzic 등(1991)도 개 Purkinje fiber, 심근 또는 심방에서 α_1 -ARs 자극으로 a_{N_s} 이 감소되거나 수축력이 감소되는데 이와 같은 효과가 α_{1b} -ARs의 자극 결과라고 하였다(Williamson 등, 1993, 1994b). 그러나 본 연구에서는 a_{N_s} 감소가 α_{1b} -ARs의 선택적인 차단제 CEC에 의해서는 영향받지 않고(자료미제시) α_{1a} -ARs의 선택적 차단제인 WB4101에 의해 완전히 차단됨으로써, Williamson 등(1993, 1994b)의 보고와는 달리 α_{1a} -ARs를 경유함을 시사하였다.

3) α_1 -ARs와 a_{N_s} 감소

PE에 의한 a_{N_s} 의 감소기전이 밝혀지면 초기 수축력 감소기전이 설명될 수 있을 것으로 생각된다. 이제까지 α_1 -ARs 자극에 의한 a_{N_s} 감소 또는 수축력 감소기전은 크게 2가지로 보고되었다. 첫째, Zaza 등(1987, 1990)과 Terzic 등(1991)은 개 Purkinje fiber나 흰쥐 심방에서 α_1 -ARs 자극으로 a_{N_s} 가 감소되는데 그 이유는 Na^+ - K^+ pump의 활성화에 의한다고 하였고, Williamson 등(1993)은 심근세포에서 PE에 의해 Na^+ - K^+ pump current가 증가함을 보고하였고 Ertl 등(1991)은 PE에 의한 Na^+ - K^+ pump 활성화의 결과라고 하였다. 둘째, Chae 등(1995)은 수축력 감소와 a_{N_s} 감소가 fast Na^+ 통로 차단제인 TTX에 의해 차단됨을 보여 수축력 감소 효과는 TTX-sensitive Na^+ 통로를 경유한 Na^+ 의 유입이 억제됨으로 Na^+ - Ca^{2+} 교환기를 통한 Ca^{2+} 의 감소로 일어난다고 하였다. 그러나 본 연구 결과에서 a_{N_s} 감소효과가 Na^+ - K^+ pump 억제제인 strophanthidin에 의해서 영향을 받지 않았을 뿐만 아니라(자료미제시) TTX 및 lidocaine에 의해서도 영향 받지 않았고 PE이 V_{max} 에도 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 연구 결과

는 상기한 연구자들에 의해 주장된 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump 활성화나 Na^+ channel을 경유한 Na^+ 유입으로 $a_{\text{N}_a}^i$ 가 감소된다는 보고와 상반되어 또 다른 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소기전이 있을 것으로 추정되었다. 또한 본 연구에서 PKC 활성화제인 PDBu 존재하에서 PE에 의한 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소효과가 차단되고 오히려 $a_{\text{N}_a}^i$ 증가효과가 관찰되었는데 이는 다음과 같이 추측된다. α_1 -ARs를 자극하면 PKC의 활성화로 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 교환기가 활성화됨으로써 $a_{\text{N}_a}^i$ 와 pH_i 또는 수축력은 증가한다. 그러나 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소는 PKC 활성화와 관련된 다른 이온전달계의 영향으로 일어날 수 있는데, 본 실험 결과에 의하면 Ca^{2+} 과의 관계를 들 수 있다. 그 증거로 첫째, PE에 의해 현저한 수축력 증가가 있을 때는 $a_{\text{N}_a}^i$ 의 증가가 동반되었다. 즉 이러한 $a_{\text{N}_a}^i$ 변동효과는 세포내 Ca^{2+} 의 농도에 의존적임을 추측할 수 있다. 둘째, 정지 심근에서는 PE에 의해 막전위와 $a_{\text{N}_a}^i$ 의 변동이 관찰되지 않았으나 고농도 Ca^{2+} 존재하에서는 PE에 의하여 과분극과 $a_{\text{N}_a}^i$ 증가효과가 관찰되었다. 셋째, PKC 활성화제에 의해서 심근의 장력이 현저히 증가된 상태에서는 PE에 의하여 과분극과 $a_{\text{N}_a}^i$ 증가가 나타났다. 즉, 심근의 장력이 증가되면 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가될 수 있기 때문에 이러한 상태에서는 $a_{\text{N}_a}^i$ 의 변동이 반전될 수 있음을 의미한다.

결과적으로 본 연구 결과에 의하면 α_1 -ARs 자극에 의한 $a_{\text{N}_a}^i$ 은 이중적인 변동으로서 감소 또는 증가, 그리고 감소와 증가가 병행될 수 있는데 이러한 $a_{\text{N}_a}^i$ 변동이 수축력 변동과 상호 밀접한 관계가 있으며, 그 중 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소는 α_{1b} -ARs 자극에 의한 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump를 활성화의 결과가 아니고 α_{1a} -ARs 자극의 결과임을 알 수 있다. 그리고 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소기전으로 Na^+ 통로를 경유한 Na^+ 유입감소가 아니고 이는 PKC를 경유한 세포내 Ca^{2+} 농도에 의존적임을 알 수 있다. 이와같이 본 연구에서는 이전 연구보고와 상반된 결과를 보였고 기니픽 개체에 따른 심근에서 $a_{\text{N}_a}^i$ 변동의 차이는 본 결과로 설명할 수 없을 뿐만 아니라 α_1 -ARs 자극시 심근에서의 다양한 효과가 있기 때문에 인정할 만한 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소기전에 대한 연구는 계속되어야 한다고

사료된다.

결 론

기니픽 심근에서 α_1 -adrenoceptors(α_1 -ARs) 자극은 2단계의 일시적인 수축력 감소에 이어서 지속적인 증가를 일으키는 것으로 알려져있다. 최근 보고에 의하면 α_1 -ARs 자극시 fast Na^+ 통로를 억제하여 Na^+ 감소를 일으킨다고 하였고, 또 다른 연구자들의 보고에 의하면 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump 활성화에 의하여 $a_{\text{N}_a}^i$ 가 감소한다고 하였으나, 아직까지 그 기전에 대해서는 명백히 규명되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 수축력 감소와 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소와의 관계, Na^+ 통로나 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump와 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소 또는 수축력 감소효과와의 관계 및 $a_{\text{N}_a}^i$ 변동이 α_1 -ARs 중 어느 subtype을 경유하는가를 평가하기 위하여 일반 미세전극, Na^+ 선택적인 미세전극과 장력 transducer을 이용하여 막전위, $a_{\text{N}_a}^i$, 및 수축력을 측정하였다. 10^{-5} M Phenylephrine (PE)은 수축기 막전위를 약간 과분극시켰고 $a_{\text{N}_a}^i$ 를 감소시키거나 증가시켰다. 수축력은 감소에 이어서 증가 또는 지속적인 증가효과를 나타냈다. PE에 의한 수축력 감소는 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소와 일치한 반면, 초기 수축력 감소없이 현저한 수축력 증가효과가 있을 때는 $a_{\text{N}_a}^i$ 의 증가가 병행되었다. 또한 V_{max} 는 PE에 의해 영향받지 않았고 PE에 의한 $a_{\text{N}_a}^i$ 감소효과는 fast Na^+ 통로 차단제인 tetrodotoxin이나 lidocaine으로 억제되지 않았으나 선택적 α_{1a} -ARs 길항제인 WB4101에 의해서 완전히 차단되었다. 고농도 Ca^{2+} 존재하에서는 $a_{\text{N}_a}^i$ 을 증가시켰고 박동심근에서 PKC 활성화제인 phorbol dibutyrate 존재하에서도 $a_{\text{N}_a}^i$ 을 증가시켰다.

이상의 결과에 의하면 기니픽 심근에서 α_1 -ARs 자극에 의한 $a_{\text{N}_a}^i$ 변동은 수축력 변동과 밀접하게 관련되며, 이같은 $a_{\text{N}_a}^i$ 의 감소는 WB4101-선택적인 α_{1a} -ARs를 경유한 PKC 활성화와 관련되어 있음을 암시한다.

참 고 문 헌

- Anyukhovskiy EP, Rybin VO, Nikashin AV, Budanova OP and Rosen MR: *Positive chronotropic responses induced by α_1 -adrenergic stimulation of normal and ischemic Purkinje fibers have different receptor-effector coupling mechanisms.* *Circ Res* 71: 526-534, 1992
- Chae SW, Gong QY, Wang DY and Lee CO: *Effects of α_1 -adrenergic receptor stimulation on intracellular Na^+ activity and twitch force in guinea-pig ventricular muscles.* *Korean J Physiol* 29: 203-216, 1995
- Del Balzo U, Rosen MR, Malfatto G, Kaplan LM and Steinberg SF: *Specific α_1 -adrenergic receptor subtypes modulate catecholamine-induced increases and decreases in ventricular automaticity.* *Circ Res* 67: 1535-1551, 1990
- Eckel J, Gerlach-Eskuchen E and Reinauer H: *α_1 -adrenoreceptor mediated increase in cytosolic free calcium in isolated cardiac myocytes.* *J Mol Cell Cardiol* 23: 617-625, 1991
- Endoh M and Blinks JR: *Actions of sympathomimetic amines on the Ca^{2+} transients and contraction of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} mediated through α - and β -adrenoceptor.* *Circ Res* 62: 247-265, 1988
- Endoh M: *Signal transduction of myocardial α_1 -adrenoreceptor: regulation of ion channels, intracellular calcium, and force of contraction. review.* *J Appl Cardio* 6: 379-399, 1991
- Endoh M, Takanachi M and Norota I: *Role of alpha 1A adrenoreceptor subtype in production of the positive inotropic effect mediated via myocardial alpha 1 adrenoreceptor in the rabbit papillary muscle: Influence of selective alpha 1A subtype antagonists WB4101 and 5-methylurapidil.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345: 578-585, 1992
- Ertl R, Jahnel U, Hawrath H, Carmeliet E and Vereecke J: *Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular heart muscle preparation from rats.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 574-581, 1991
- Fedida D and Bouchard RA: *Mechanisms for the positive inotropic effect of α_1 -adrenoreceptor stimulation in rat cardiac myocytes.* *Circ Res* 71: 673-668, 1992
- Gambassi G, Spurgeon HA, Lakatta EG, Blank PS and Capogrossi MC: *Different effect of α - and β -adrenergic stimulation on cytosolic pH and myofilament responsiveness to Ca^{2+} in cardiac myocytes.* *Circ Res* 71: 870-882, 1992
- Han C, Abel PW and Minneman KP: *Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chloroethylclonidine.* *Mol Pharmacol* 32: 505-510, 1987
- Im WB and Lee CO: *Quantitative of twitch and tonic tensions to intracellular Na^+ activity in cardiac Purkinje fibers.* *Am J Physiol* 247: C478-C487, 1984
- Iwakura K, Hori M, Watanabe Y, Kitabatake A, Cragoe EJ, Yoshida H and Kamada T: *α_1 -adrenoreceptor stimulation increase intracellular pH and Ca^{2+} in cardiomyocytes through Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange.* *Eur J Pharmacol* 186: 29-40, 1990
- Jahnel U, Nawrath H, Shieh RC, Sharma VK, Williford DJ and Sheu SS: *Modulation of cytosolic free calcium concentration by α_1 -adrenoreceptors in rat atrial cells.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346: 88-93, 1992
- Kim JS, Chae SW and Cho KP: *Effects of α_1 -adrenoreceptor stimulation on membrane potential, twitch force, intracellular Na^+ , and H^+ activity in hyperthyroid guinea pig ventricular muscle.* *Korean J Pharmacol* 31: 39-51, 1995
- Minneman KP: *α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} .* *Pharmacol Rev* 40: 87-119, 1988
- Minneman KP, Han C and Abel PW: *Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chloroethylclonidine and WB4101.* *Mol Pharmacol* 33: 509-514, 1988

- Otani H, Otani H and Das DK: α_1 -Adrenoceptor-mediated phosphoinositide breakdown and inotropic response in rat left ventricular papillary muscles. *Circ Res* 62: 8-17, 1988
- Otani H, Uriu T, Hara M, Inoue M, Omori K, Edward J, Cragoe JR and Inagaki C: Effects of inhibitors of protein kinase C and Na^+/H^+ exchange on α_1 -adrenoceptor-mediated inotropic response in the rat left ventricular papillary muscle. *Br J Pharmacol* 160: 207-210, 1990
- Scholz J, Schaefer B, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M, Lohse M, Schwabe U and Puurunen J: Alpha-1 adrenoceptor-mediated positive inotropic effect and inositol triphosphate increase in mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 327-335, 1988
- Steinberg SF, Kaplan LM, Inouye T, Zhag JF and Robinson RB: Alpha-1 adrenergic stimulation of 1,4,5-inositol triphosphate formation in ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 1141-1148, 1989
- Terzic A, Anagnostopoulos T and Vogel SM: Opposite modulation of ouabain cardiotoxicity by hexamethylenamiloride and phenylephrine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343: 511-518, 1991
- Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F and Vassort G: α_1 -Adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol* 447: 275-292, 1992
- Tohse N, Hattori Y, Nakaya H and Kanno M: Effects of α_1 -adrenoceptor stimulation on electrophysiological properties and mechanics in rat papillary muscle. *Gen Pharmacol* 18: 539-546, 1987
- Vaughan-Jones RD, Wu ML and Bountra C: Sodium-hydrogen exchange and its role in contractility during acidosis in cardiac muscle. *Mol Cell Biochem* 89: 157-162, 1989
- Vassalle M and Lee CO: The relationship among intracellular sodium activity, calcium and strophanthidin inotropic response in canine cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 83: 287-307, 1984
- Williamson A, Kennedy RH, Stufen E, Lindemann JP and Stimers JR: α_{1B} -adrenoceptor-mediated stimulation of Na-K pump current in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 264: H1315-H1318, 1993
- Williamson AP, Seifen E, Lindemann JP and Kennedy RH: WB4101- and CEC-sensitive positive inotropic actions of phenylephrine in rat cardiac muscle. *Am J Physiol* 266: H2462-H2467, 1994a
- Williamson AP, Seifen E, Lindemann JP and Kennedy RH: Effects of WB4101 and chloroethylclonidine on the positive and negative inotropic actions of phenylephrine in rat cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1174-1182, 1994b
- Wilson KM and Minneman KP: Different pathways of [^3H] inositol phosphate formation mediated by α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors. *J Biol Chem* 265: 17601-17606, 1990
- Yu GS and Han C: Role of α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptors in phenylephrine-induced positive inotropic response in isolated rat left atrium. *J Cardiovascul Pharmacol* 24: 754-752, 1994
- Zaza A, Kline RP and Rosen MR: Effects of Alpha-adrenergic stimulation on intracellular Na activity. *Circ* 76: suppl V-62, 1987
- Zaza A, Kline RP and Rosen MR: Effect of α -adrenergic stimulation on intracellular sodium activity and automaticity in canine Purkinje fibers. *Circ Res* 66: 416-426, 1990