

흰쥐 심근의 역 사다리 효과에 있어서 생후 연령에 따른 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환의 역할에 관한 연구

이 해 용¹ · 김 순 진² · 고 창 만²

연세대학교 원주의과대학 ¹소아과학교실, ²약리학교실 및 기초의학 연구소

Studies on the Roles of $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ Exchange according to Postnatal Age in the Negative Staircase Effect of the Rat Heart. Hae-yong Lee¹, Soon Jin Kim² and Chang Mann Ko² Department of ¹Pediatrics and ²Pharmacology, Wonju-College of Medicine and Institute of Basic Medicine, Yonsei University, 162 Wonju, Kangwon-Do 220-701, R.O.Korea

Recent reports revealed that the $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchangers and feet structures of sarcoplasmic reticulum(SR) are located in close vicinity in the specific compartment. Therefore, we investigated the possibility that the $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger may decrease the tension development by transporting the Ca^{2+} out of the cell right after it released from SR, on the basis of this anatomical proximity. We examined the negative force-frequency relationship of the developed tension in the electrically field stimulated left atria of postnatal developing rat(1, 3 day, 1 week and 4 week old after birth). Cyclopiazonic acid(3×10^{-5} M) treatment decreased the developed tension further according to postnatal age. Monensin(3×10^{-6} M) treatment did not increase the maximal tension in 4 week-old rat, preserving negative staircase, while the negative staircase in the younger rat were flattened. Ca^{2+} depletion in the buffer elicited more suppression of the maximal tension according to the frequency in all groups except the 4 week-old group. The % decrease of the maximal developed tension of 4 week-old group at 1 Hz to that of 0.1 Hz after Na^+ and Ca^{2+} depletion was only a half of those of the younger groups. Taken together, it is concluded that the $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange transports more Ca^{2+} released from SR out of the cell in proportion to the frequency, and this is responsible for the negative staircase effect of the rat heart.

Key Words: Postnatal developing heart, Rat, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange, Monensin, Sarcoplasmic reticulum, Negative staircase effect

서 론

심근 수축은 세포질내의 자유 Ca^{2+} 농도가 증가함에 따라 촉발되고, 다시 자유 Ca^{2+} 농도가 감소함에 따라 이완된다. 수축력은 각 수축 주기에서 도달되는 최대 자유 Ca^{2+} 농도에 의해 결정된다. 자유 Ca^{2+} 농도는, 심근의 활성 전압 주기에 따라 세포 외부에서 유입되는 Ca^{2+} 과, 근 소포체에 저장 되어있다가 유리되는 Ca^{2+} 들에 의해 그 농도가 증가되고, 다시 근 소포체로 재섭취되거나, 세포 외부로 배출됨으로 그 농도가 안정 상태로 떨어지게

된다(Fozzard, 1977; Chapmann, 1983; Wier 1990). 그러므로 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 이동이나, 근 소포체의 Ca^{2+} 재섭취 혹은 유리 기능을 변동시키는 모든 기전은 바로 심근 수축 운동을 변동시키게 된다.

$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환은 Na^+ 의 전기 화학적 격차를 원동력으로 하여 운반체를 통해 Na^+ 과 Ca^{2+} 이 맞교환되는 것이므로, 세포 내외의 Na^+ 과 Ca^{2+} 의 농도 변화에 따라 그 이동 방향이 변화되어, Ca^{2+} 을 세포내로 유입시키기도 하고(역방향 형태, reverse mode), 세포밖으로 유출시킬 수도 있다(정방향 형태, forward mode)(Blaustein, 1974). 그러므로, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환은 심근 수축 운동의 촉발과 이완의 전과정에 관여하게 되며, 그 활성의 변동에 따라 심근 수축 운동을 항진시킬 수도 있고, 감소시킬 수도 있다.

아울러 Na^+ - Ca^{2+} 교환 기전은, Ca^{2+} 운반 능력이 매우 크기 때문에(Carafoli, 1987), 심근 수축 기전에 있어서 지대한 역할을 담당하고 있는 것으로 믿고 있다.

한편, 심근의 수축력은 수축 빈도가 변함에 따라 증감되며, 그 양상은 종에 따라 크게 두가지로 달라진다. 사람을 포함한 대부분의 종에서는 수축 빈도 증가에 따라 수축력도 비례하여 증가되는 정사다리 효과(positive staircase effect)를 나타내나, 흰쥐를 위시한 생쥐, ferret 등에서는 수축 빈도 증가에 반비례하는 역사다리 효과(negative staircase effect)를 나타낸다(Woodworth, 1902; Bers & Christensen, 1990). 정사다리 효과가 나타나는 기전은 쉽게 설명이 된다. 즉, 수축 빈도 증가에 따라 세포내의 Na^+ 농도가 증가되고, 이는 정방향 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 억제하여 Ca^{2+} 유출을 감소시켜 세포질내의 이완기 유리 Ca^{2+} 농도를 증가시키므로, 근 소포체로의 Ca^{2+} 재섭취가 증가되어, 다음 수축시 더 많은 Ca^{2+} 이 유리되어 수축력을 향진시키게 된다. 또한 역방향 Na^+ - Ca^{2+} 교환에 의한 Ca^{2+} 유입 역시 증가될 것이므로, 세포내 수축기 자유 Ca^{2+} 농도가 증가되어 수축력의 향진을 더욱 촉진시키게 된다(Bers & Christensen, 1990; Frampton et al, 1991; Harrison & Boyett, 1995).

그러나, 역사다리 효과의 기전에 대해서는 아직 뚜렷한 설명이 제시되지 못하고 있는 실정이다. 그렇지만, 흰쥐등 역사다리 효과를 나타내는 종들의 심근에서도 수축 빈도가 증가됨에 따라 이에 비례하여 일차적으로 Na^+ 농도가 증가되는 것으로 보고(Jelics & Gupta, 1994; Lostan et al, 1995)되고 있으므로, Na^+ - Ca^{2+} 교환이 어떠한 형태로든지 역사다리 효과 발현에도 관여하리라는 것은 쉽게 추측할 수 있다. 단, 최종적으로 나타나는 수축 운동은 정사다리 효과를 나타내는 종에서와는 달라지므로, Na^+ - Ca^{2+} 교환 활성의 변동 양상이 정사다리 효과를 나타내는 종들에서와는 다른 양상으로 전개되거나, 아니면 Na^+ - Ca^{2+} 교환의 활성 변동은 같은 양상으로 나타나지만 기타 다른 기전에서 차이점이 존재하여 심근 수축을 유발하는 최종 과정의 차이가 발생할 수 있는 두가지 가능성이 존재할 것이다. 그러므로, 이러한 두 가지 가능성중에서 어느것이 옳은 것인가 규명하는 것은 역사다리 효과의 기전 설명에 있어서 중요한 기반이 될 것이며, 한 걸음 더 나아가 심근의 흥분-수축 연결(Excitation-Contraction Coupling) 기전의 규명에 중요한 일익을 담당하게 될 것이다.

그리하여, 본 연구에서는 흰쥐의 경우 생후 연령에 따라 근 소포체의 발달과 기능 정도가 다른 점(Olivetti et al, 1980; Chin et al, 1990; Vonaren, 1992)을 이용하여, 근 소포체가 완전히 성숙되기까지의 각 단계에서, 수축 빈

도 변경에 따른 수축력 변동에 대한 Na^+ - Ca^{2+} 교환의 역할을 비교 관찰함으로써, 심근 수축 유발 과정에 가장 중요한 두가지 기전, 즉 Na^+ - Ca^{2+} 교환과 근 소포체의 기능 간의 상호 연관 관계를 규명하여 역사다리 효과가 발현되는 기전을 추구하고자 하였다.

방 법

적출 좌심방 표본

생후 1일, 3일, 1주, 4주의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하여, 경추 탈골로 희생시킨 후 즉시 심장을 적출하고, Krebs Hensleit buffer(KHB)내에서 계속 산소를 공급하면서 좌심방을 분리하였다. 분리한 좌심방을 한 쪽 끝은 8 ml 용적의 이중벽 초자제 muscle chamber내에 고정하고 다른 한 끝은 force displacement transducer(FT .03, Grass, USA)에 고정하였다. 보온시킨 물을 muscle chamber 이중벽내에 계속 순환시켜 KHB의 온도를 37°C로 유지하고, O_2 와 CO_2 를 flow regulator(FR355K, Cobe, USA)를 통해 각각 95%와 5%로 조절하여 KHB의 pH를 7.40 ± 0.03 으로 유지하였다. Digital stimulator (STM-1000, Hansung, Korea)로 supramaximal voltage의 square wave pulse를 0.5 msec 동안 3 Hz로 백금 전극을 통해 좌심방을 전기장 자극함으로써 수축 운동을 유발하면서 30분 동안 안정시켰다. KHB는 전 실험기간을 통해 10분 간격으로 갈아주었다. 수축 운동은 force displacement transducer를 통해 Polygraph(Model 7, Grass, USA)에 묘사하였다. 근 소포체내의 Ca^{2+} 저장량은 자극 빈도에 비례하므로(Frampton et al, 1991), 본 실험에서는 안정시 자극 빈도를 3 Hz로 유지하며 근 소포체내의 Ca^{2+} 저장량을 일정한 상태로 유지하고 나서, 자극 빈도를 변경시키는 실험을 진행하였다. 즉 3 Hz의 안정상태에서 전기장 자극 빈도를 0.1 Hz로 5분 동안 갑자기 낮출 때 나타나는 수축양상 및 수축력의 변동을 관찰하고, 다시 3 Hz로 올려 20분간 다시 안정시켰다. 같은 방법으로 0.3, 0.5, 0.7, 1 Hz로 5분간 자극 빈도를 변경시킬 때 나타나는 수축력의 변동을 관찰하여, 수축력-수축 빈도 상관 관계를 graph로 나타내었다. 영양액 내 Ca^{2+} 혹은 Ca^{2+} 및 Na^+ 배제시의 영향을 관찰하는 경우에는 세포막에 결합되어 있는 Ca^{2+} 을 씻어내기 위하여 이들 이온을 배제한 영양액을 2번씩 반복하여 갈아주었다.

적출 심방의 약물 반응

Na^+ ionophore인 Monensin을 3×10^{-6} M을 투여하거나, NiCl_2 5 mM 또는 Na^+ 및 Ca^{2+} 을 배제한 KHB공급을

통해 Na^+ - Ca^{2+} 교환의 활성을 변동시켰으며, 근 소포체의 기능은 cyclopiazonic acid 3×10^{-5} M, 혹은 ryanodine 3×10^{-9} M을 투여하여 억제시켰다. 또한 L-type Ca^{2+} channel을 봉쇄하기 위해 verapamil 3×10^{-5} M 혹은 NiCl_2 0.1 mM을 투여하였다. Monensin, NiCl_2 , 및 verapamil의 경우 약물을 투여하고 5분간 방치하여 약물작용이 최대에 도달한 후 자극 빈도를 변경시켜 실험을 진행하였으며, Na^+ 및 Ca^{2+} 배제시에는 이들을 배제한 KHB를 신속하게 두 번 반복 교환한 후 즉시 자극 빈도를 저하시켰다. 한편, cyclopiazonic acid 혹은 ryanodine의 경우에는 약물 처치후 시간이 지날수록 심근 수축 억압 효과가 강하여 지므로, 약물 투여후 최소한 40분이상 방치하고나서 자극빈도저하 실험을 실행하였다. 이때 영양액은 20분 간격으로 교환하고, 즉시 약물을 재투여하였다. 한편, Na^+ 및 Ca^{2+} 배제실험의 경우에는 같은 조직에서 정상 영양액을 적용한 대조 실험과 Na^+ 및 Ca^{2+} 배제실험을 반복 실행하였다.

본 실험에 사용한 KHB의 조성은 다음과 같다(단위 mmol/l). NaCl 118, KCl 4.70, CaCl_2 2.52, MgSO_4 1.16, NaHCO_3 24.88, KH_2PO_4 1.18, Na-Pyruvate 2.0, Glucose 5.55(Na^+ 배제시에는 같은 농도의 sucrose로 대체하여 삼

투압을 유지하였고, Ca^{2+} 배제시에는 CaCl_2 을 배제하고 다른 보충은 하지 않았다.)

실험 결과의 처리

3 Hz의 안정 상태에서 norepinephrine 10^{-6} M 투여시 유발되는 최대 수축 장력을 100으로 하여, 관찰된 수축 장력을 %로 표시하였다. 또한 Na^+ 및 Ca^{2+} 배제실험의 경우, 필요시에는 같은 조직에서 정상 영양액을 적용한 대조군에 대한 %로 증감을 표시하거나, 자극 빈도 0.1 Hz에 대한 % 감소로 표시하기도 하였다. 각군의 수축장력을 unpaired Students' t-test로 비교하여 p값이 0.05보다 작을 때 유의있는 것으로 판정하였다.

실험 성적

흰쥐 좌심방의 수축력-빈도 상관 관계

흰쥐 좌심방은 전기장 자극 빈도를 3 Hz에서 0.1 Hz로 갑자기 낮춤에따라 수축 장력이 급격히 증가하기 시작하여 약 30초 후에는 최대 수축 장력을 나타내었다. 이후 약 3분동안에 걸쳐 수축 장력이 감소하고 이어서 안정되

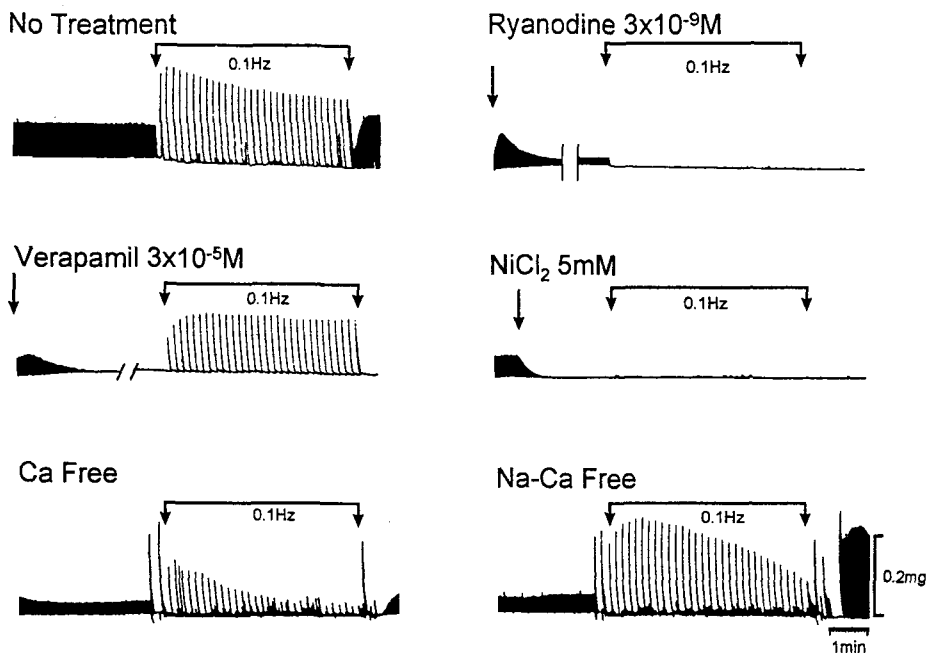


Fig. 1. Effects of L-type Ca^{2+} channel, Na^+ - Ca^{2+} exchange or SR Ca^{2+} release blocking on the changes of left atrial contractions after frequency reduction from 3 Hz to 0.1 Hz in 4-week old rat. Left atrial contraction was evoked by electrical field stimulation(0.5 msec duration, supramaximal voltage) through platinum electrodes. Stimulation frequency was reduced from resting 3 Hz to 0.1 Hz for 5 minutes.

어지는 3단계의 변동을 나타내었다(Fig. 1). 자극빈도를 0.3, 0.5, 0.7 또는 1 Hz로 낮출 때에도, 비록 최대 수축 장력 및 안정시 장력이 자극빈도에 따라 감소하지만, 그 수축 운동은 같은 양상으로 전개되었다(결과는 제시하지 않았음). 자극 빈도 저하로 나타나는 최대 수축 장력은

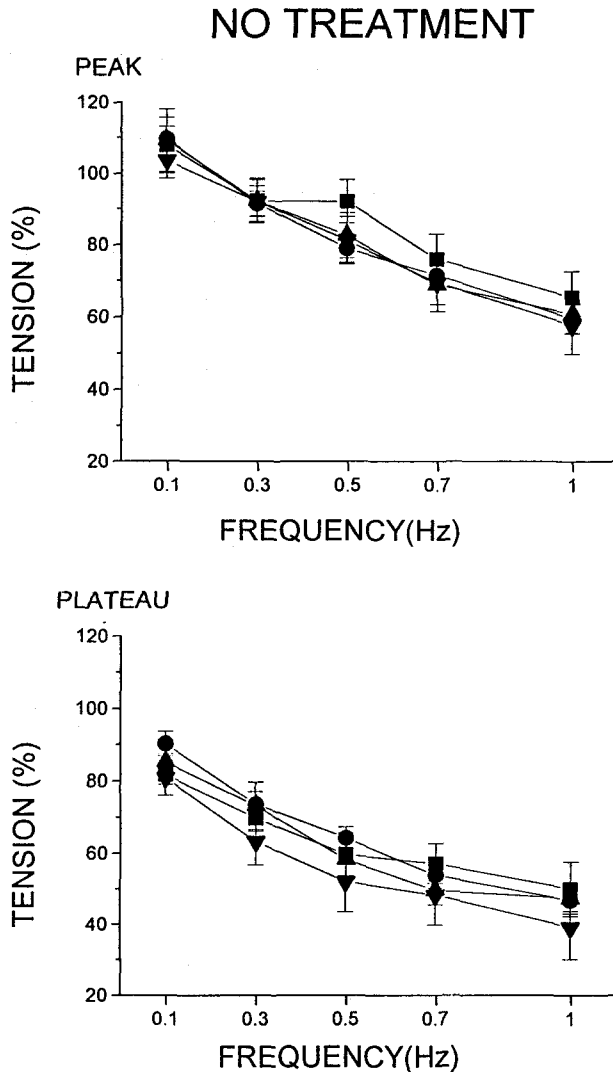


Fig. 2. Frequency-Force Relationships of electrically field stimulated left atria of postnatal developing rat. Electrical field stimulation rate was decreased from 3 Hz to destined frequencies for 5 minutes. Developed tension was calculated as % of maximal tension response to norepinephrine 10^{-6} M. PEAK: developed maximal tension during frequency reduction for 5 minutes. PLATEAU: developed tension at the end of 5 minutes-frequency reduction. Means \pm SEM were plotted. [-■- 1 DAY (n=4), -●- 3 DAY (n=8), -▲- 1 WEEK (n=7), -▼- 4 WEEK (n=6)]

NE 10^{-6} M 투여로 유발되는 최대 수축 장력에 대한 %로 환산할 경우 0.1 Hz에서는 생후 1일, 3일, 1주 및 4주군에서 각각 108 ± 7.8 , 110 ± 3.3 , 109 ± 8.8 및 $104 \pm 5.0\%$ 로 NE에 비해서는 미약하나마 증가되지만, 생후 연령에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 최대 수축 장력은 자극 빈도가 증가함에 따라 계속 감소하여, 1 Hz에서는 65 ± 7.3 , 60 ± 4.0 , 61 ± 5.2 및 $58 \pm 7.8\%$ 로 특징적인 역사다리 효과를 나타내었으나, 역시 생후 연령에 따른 차이는 나타나지 않았다. 한편 안정 수축 장력 역시 생후 연령에 따른 차이는 관찰할 수 없었으며, 자극 빈도가 증가함에 따라 각 자극 빈도에서 유발되는 최대 수축 장력의 80%정도를 유지하며 역사다리 효과를 나타내었다(Fig. 2).

생후 연령에 따른 cyclopiazonic acid의 수축 운동 억제 작용

근 소포체의 Ca^{2+} ATPase를 억제하는 cyclopiazonic acid (3×10^{-5} M) 처치(Demaurex et al, 1992)는 전기장 자극으로 유발한 흰쥐 좌심방의 수축 운동을 억제시켰다. 먼저 최대 수축 장력의 경우, 빈도 0.1 Hz시 생후 1일, 3일 및 1주군에서는 71 ± 9.8 , 52 ± 7.8 , $52 \pm 7.6\%$ 를 나타내었으나, 생후 4주군에서는 $16 \pm 2.5\%$ 로 강력하게 억제가 되었다. 이후 자극 빈도가 증가함에 따라, 생후 1일, 3일 및 1주군에서는 빈도에 역비례하여 계속 감소되어 역사다리 효과는 보존되었으나, 생후 4주군에서는 자극 빈도 증가와 무관하게 계속 같은 정도의 최대 수축 장력의 억제를 나타내어 역사다리 효과는 소실되었다. 한편, 안정 수축 장력의 경우에는 cyclopiazonic acid처치에 의해 생후 연령에 상관없이 수축 장력이 현저하게 감소되었으며, 빈도 증가에 따른 역사다리 효과는 모든 연령군에서 공히 소실되었다(Fig. 3).

Ryanodine 혹은 verapamil의 작용

근 소포체의 Ca^{2+} 유리 기능을 억제하는 약물인 ryanodine(Nagasaki & Fleischer, 1988; Tanaka & Shigenobu, 1989)을 극히 낮은 농도인 3×10^{-9} M로 처치함으로써 생후 4주된 좌심방의 자극빈도를 0.1 Hz로 저하시킴에 따른 수축력 향진이 완전히 봉쇄되었다(Fig. 1). Ryanodine의 이러한 빈도저하시의 수축운동 봉쇄 작용은 생후 1일, 3일 및 1주군에서도 동일하게 나타났으며, 0.3Hz에서 1Hz까지 자극 빈도가 변경되어도 수축 운동을 완전히 봉쇄하였다(결과는 제시하지 않았음).

한편 L-type Ca^{2+} channel 봉쇄 약물인 verapamil 3×10^{-5} M 처치시에는 3 Hz로 자극하는 휴지기의 수축 운동을 수분내에 완전히 봉쇄하였다. 그러나 자극 빈도를 5분동안 저하시킴에 따라 수축운동이 재발되었다. 즉, 자극 빈

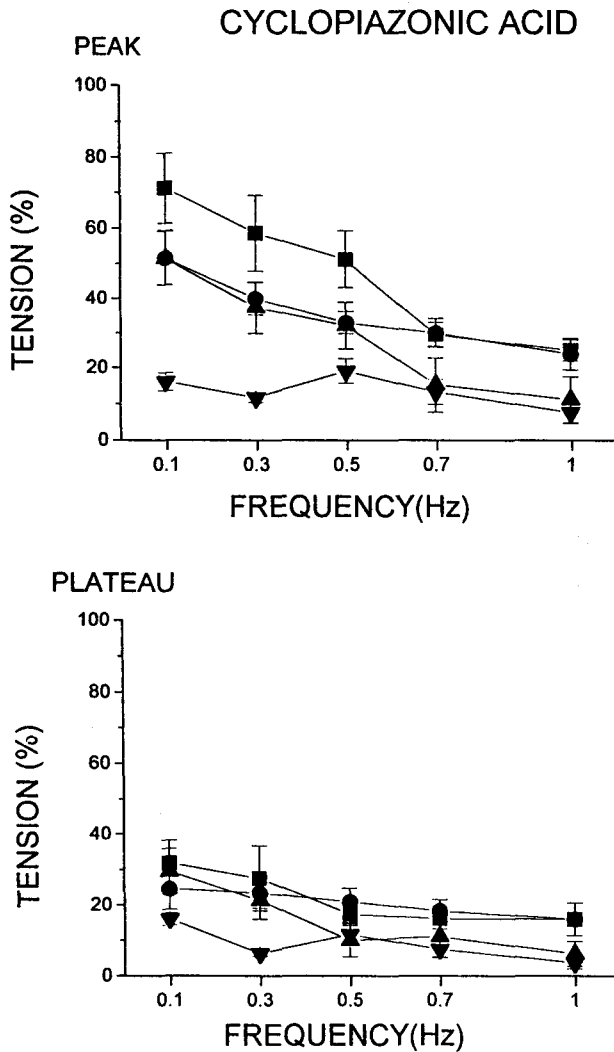


Fig. 3. Frequency-Force Relationships of electrically field stimulated left atria of postnatal developing rat after cyclopiazonic acid(3×10^{-5} M) treatment. [-■- 1 DAY (n=6), -●- 3 DAY (n=6), -▲- 1 WEEK (n=5), -▼- 4 WEEK (n=7)] Other legends are same as Fig. 2.

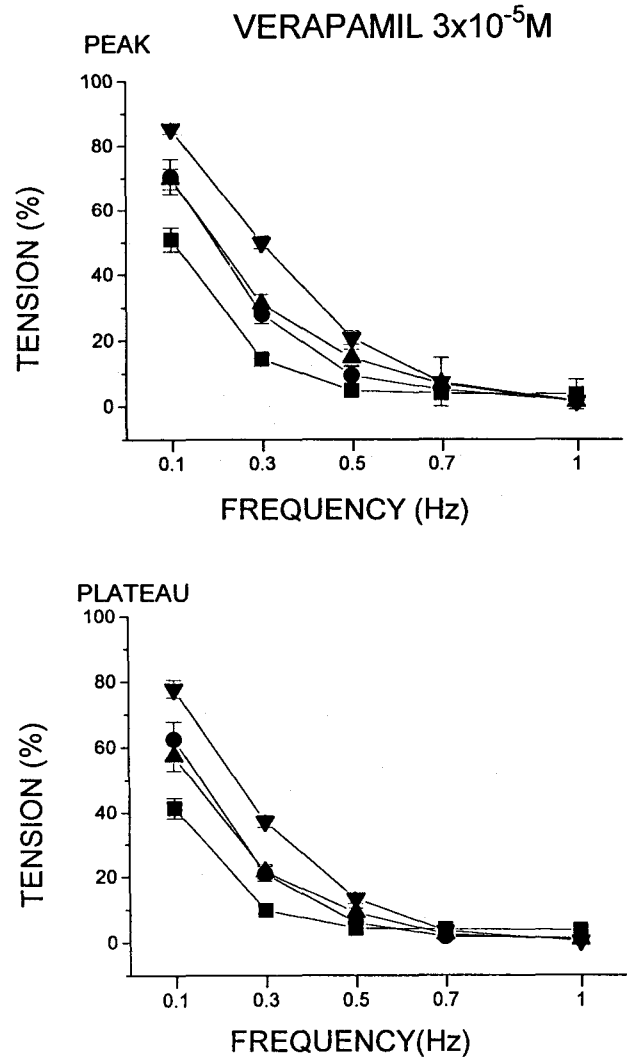


Fig. 4. Frequency-Force Relationships of electrically field stimulated left atria of postnatal developing rat after verapamil(3×10^{-5} M) treatment. [-■- 1 DAY (n=7), -●- 3 DAY (n=7), -▲- 1 WEEK (n=7), -▼- 4 WEEK (n=6)] Other legends are same as Fig. 2.

도가 0.7 Hz 이상에서는 재발되는 수축 운동이 거의 미미 하였으나, 자극 빈도가 낮아짐에 따라 수축 운동 재발이 점점 현저하여져 0.1 Hz에서는 생후 4주 좌심방의 경우 수축력이 85 ± 1.6 %로 대조군에 거의 육박하였다. 재발 되는 수축 운동의 장력은 생후 연령에 비례하여, 생후 1 일군에서 가장 작았고, 생후 4주군에서 가장 현저하였다 (Fig. 1 및 Fig. 4). 반면, 역시 L-type Ca²⁺ channel을 봉쇄 하는 것으로 알려져 있는 0.1 mM의 NiCl₂(Klitzner 및 Morad, 1983; Kimura et al, 1987) 처치시에는 생후 연령에 상관없이 대조군에 비해 별다른 수축 억제제가 나타나지

않았다(Fig. 5).

Na-Ca 교환 활성의 변동이 미치는 영향

Na-Ca 교환을 억제시키는 것으로 알려져 있는 5 mM의 NiCl₂(Kimura et al, 1987; Callewaert et al, 1989)를 생후 4주된 좌심방에 처치시에는 3Hz에서 수축 운동이 소실 되어 자극 빈도를 0.1Hz로 저하시켜도 수축 운동이 재발 되지 않았다(Fig. 1). 이러한 NiCl₂의 작용은 생후 연령과, 자극 빈도에 상관없이 동일하였다(결과는 제시하지 않았 음.). 한편, KHB내의 Ca²⁺만을 배제시키면 수축력의 현

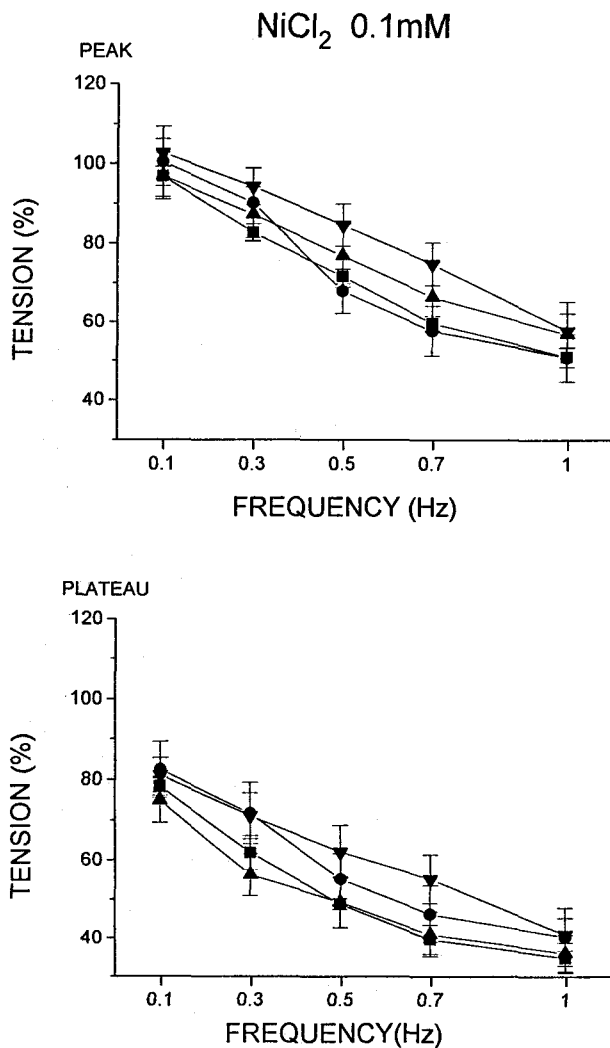


Fig. 5. Frequency-Force Relationships of electrically field stimulated left atria of postnatal developing rat after NiCl_2 (0.1 mM) treatment. [■- 1 DAY (n=5), ●- 3 DAY (n=6), ▲- 1 WEEK (n=6), ▼- 4 WEEK (n=6)] Other legends are same as Fig. 2.

저한 감소는 나타나지만, 자극빈도를 0.1 Hz로 낮추어도 5분동안에 걸쳐 수축 운동이 소실되지 않았다(Fig. 1). Ca^{2+} 배제에 의한 이러한 효과는 생후 연령에 상관없이 같은 양상을 나타내었으며(결과는 제시하지 않았음), 자극 빈도증가에 따른 역사다리 효과도 계속 보존되었다(Fig. 6). 그러나 대조군에 대한 감소율(%)을 산출하여본 결과 생후 1일군에서는 자극 빈도에 비례하여 증가하지만, 3일 1주로 생후 연령이 증가함에 따라 자극빈도에 따른 증가정도가 감소하여, 생후 4주군에서는 자극 빈도와 무관하게 일정한 감소율을 나타내었다(Fig. 7). 한편, Na^+

과 Ca^{2+} 을 배제시켜 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 완전히 봉쇄하면(Bers & Christensen, 1990; Wolska & Lewartowski, 1993), 수축 운동은 현저하게 항진되었으며, 이 경우에도 관찰한 5분동안 결코 수축운동의 소실은 나타나지 않았다(Fig. 1). 그러나, Ca^{2+} 만을 배제시킨 경우와는 달리, 생후 1일, 3일 및 1주군에서는 역사다리 효과가 계속 보존되나, 생후 4주군에서는 수축력의 증가가 자극 빈도 증가에 따라 더욱 현저하여져서 역사다리 효과가 완전히 소실되었다(Fig 6). 아울러, 0.1 Hz에서의 최대 수축 장력에 대한 1 Hz에서의 최대 수축 장력의 감소율(%)은 전체적으로 대조군에 비해 현저하게 감소되며, 특히 생후 4주군에서는 다른 연령군의 반으로 현저하게 감소되어 $10.7 \pm 2.6\%$ 를 나타내었다($p < 0.05$, Fig. 8). 한편, Na^+ ionophore인 monensin 3×10^{-6} M을 투여하면, 0.1 Hz에서의 최대 수축 장력에 대한 1 Hz에서의 최대 수축 장력의 감소율(%)이 생후 1일, 3일 및 1주군에서는 대조군에 비해 현저하게 감소되어 Na^+ 및 Ca^{2+} 배제군에서의 감소정도와 같아지나, 생후 4주군에서는 대조군보다 오히려 증가하며, 다른 연령군에 비해서도 2배이상 증가되었다($p < 0.001$, Fig. 8).

고 찰

흰쥐 심근의 근소포체는 완전히 못한 상태로 출생하여, 생후 2일부터 11일 사이에 근 소포체의 몸체와 말단 연결 근 소포체(peripheral junctional sarcoplasmic reticulum)가 뚜렷하게 형성되며, 출생후 2주로부터 3주까지 T-tubule과 내부 연결 근 소포체(internal junctional sarcoplasmic reticulum)가 완성된다(Olivetti et al, 1980; Chin et al, 1990; Vonaren, 1992). 그러므로, 본 연구에서 사용한 생후 1일, 3일 및 1주군은 근소포체의 성장 및 기능이 완전히 못한 상태이며, 생후 4주군은 근 소포체의 성장이 완성되어 거의 완전한 기능을 나타내게 된다. 이러한 사실은 근 소포체의 Ca^{2+} -ATPase를 억제하는 cyclopiazonic acid(Demaurex et al, 1992)를 처치함으로 저빈도 자극으로 전환시 나타나는 수축 장력이 생후 연령에 비례하여 억제되는 결과로도 확인할 수 있다(Agata et al, 1993). 그러나, 근 소포체의 Ca^{2+} 유리통로를 봉쇄하는 약물인 ryanodine(Nagasaki & Fleischer, 1988; Tanaka & Shigenobu, 1989) 투여시 생후 연령에 상관없이 수축 운동이 완전히 소실되는 결과로 보아 생후 1일된 흰쥐의 심근에서조차도 근 소포체의 기능은 비록 불완전하다 할 지라도 이미 어느정도는 형성되어 있어 심근 수축 운동을 지배하는 것으로 판단된다(Chin et al, 1990; Agata et al, 1993).

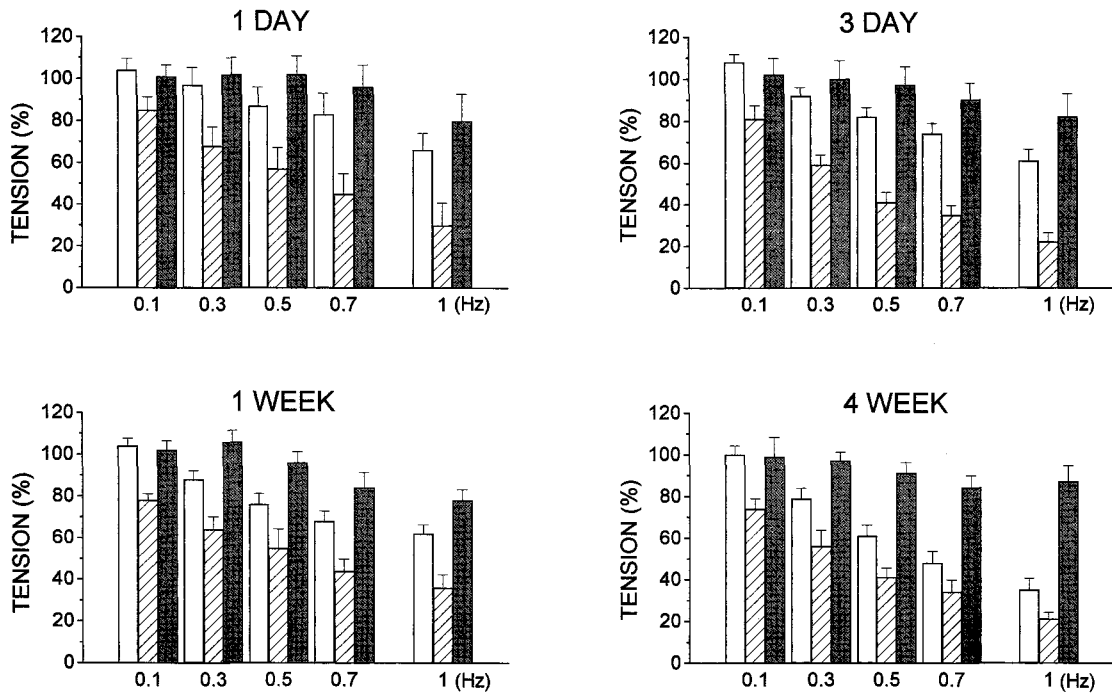


Fig. 6. Effects of Na⁺ or Na⁺ and Ca²⁺ depletion on the maximal developed tension after frequency reduction from 3 Hz to destined frequency in the left atria of postnatal developing rat. [□ CONTROL, ▨ Ca FREE, ■ Na, Ca FREE] Other legends are same as Fig. 2.

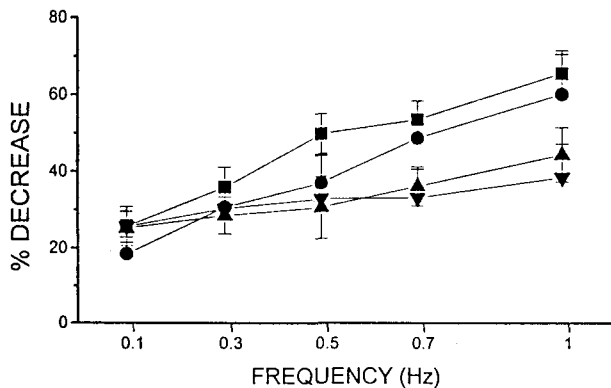


Fig. 7. Effects of Ca²⁺ depletion on the maximal developed tension after frequency reduction from 3 Hz to destined frequencies in the left atria of postnatal developing rat. Ordinate: % decrease of developed tension after Ca²⁺ depletion from control. [■- 1 DAY (n=7), ●- 3 DAY (n=7), ▲- 1 WEEK (n=8), ▼- 4 WEEK (n=6)] Other legends are same as Fig. 2.

뿐만아니라 영양액내의 Ca²⁺을 배제할 경우 대조군에 대한 수축 장력의 감소 비율이 생후 1일군에서는 자극 빈도에 비례하여 증가하던 것이 생후 연령 증가에 따라

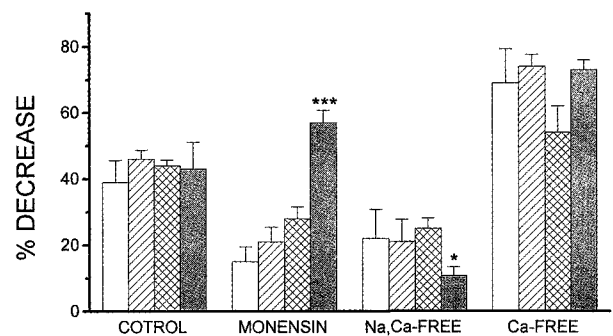


Fig. 8. Effects of monensin(3×10^{-6} M), Ca²⁺ depletion or Na⁺ and Ca²⁺ depletion on the maximal developed tension after frequency reduction from 3 Hz to destined frequencies in the left atria of postnatal developing rat. Ordinate: % decrease of the maximal developed tension at 1 Hz from that at 0.1 Hz. [□ 1 DAY, ▨ 3 DAY, ▩ 1 WEEK, ■ 4 WEEK] (*p<0.05, *** p<0.001 compare with 1 week) Other legends are same as Fig. 2.

점점 줄어들어 생후 4주군에서는 자극 빈도와 무관하게 거의 일정한 감소를 나타내는 것으로 보아, 내부 Ca²⁺의 심근 수축에 대한 기여도가 근 소포체의 기능 발달에 비

례하여 점점 커지는 것으로 판단된다(Vonaren, 1990; Agata et al, 1993). 이러한 사실은 verapamil 투여로 L-type Ca^{2+} channel을 봉쇄하면 3 Hz의 고빈도에서는 수축 운동이 완전히 소실되나, 자극 빈도를 저하함에 따라 수축 운동이 재발되며, 그 수축력의 크기는 생후 연령에 반비례하는 결과로도 확인된다. 한 걸음 더 나아가, verapamil 투여 후 재발되는 수축 장력이 저빈도에서 훨씬 커지는 것으로 보아 근 소포체의 성숙도가 동일한 상태에서도 빈도가 감소할수록 근 소포체로부터 유리되는 내부 Ca^{2+} 의 심근 수축에 대한 기여도가 커지는 것을 확인할 수 있다. 아울러 0.1 mM의 $NiCl_2$ 처치시에 아무런 봉쇄도 나타나지 않는 결과는, 이 농도에서는 L-type Ca^{2+} 통로를 봉쇄(Klitzner & Morad, 1983; Kimura et al, 1987)는 하지만, 그 강도가 약하기 때문인 것으로 판단되며, 이 역시도 빈도 저하로 유발되는 수축 운동이 외부 보다는 내부 Ca^{2+} 에 더욱 지배를 받기 때문에 나타나는 결과로 해석된다.

심근의 수축 빈도가 변경되면, 세포질내의 유리 Na^+ 농도도 따라서 증가되어져(Jelics & Gupta, 1994; Lostan et al, 1995), 그 결과 Na^+-Ca^{2+} 교환 활성이 변동된다(Field et al, 1996). 이러한 사실은 흰쥐에서도 같은 결과가 나타나는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 흰쥐에서 발현되는 빈도 변경에 따른 역사다리 효과에는 Na^+-Ca^{2+} 교환의 역할이 일익을 담당하고 있을 것으로 추측할 수 있다. Na^+-Ca^{2+} 교환을 봉쇄하는 5 mM의 $NiCl_2$ (Kimura et al, 1987; Callewaert et al, 1989) 처치시 빈도 저하에 따른 수축 운동이 완전히 봉쇄되어 없어지는 결과로 보아 이러한 추측은 근거가 있는 것으로 믿어진다.

한편, Na^+ ionophore인 monensin을 처치하면, 근 소포체의 기능이 완전하지 않은 연령군에서는 수축력이 항진되어 1 Hz에서 유발되는 최대 수축 장력의 0.1 Hz에 대한 감소 비율이 작으나, 근 소포체의 기능이 완성되어진 생후 4주군에서는 오히려 감소 비율이 현저하게 커지는 본 실험 결과는 특별한 흥미를 불러 일으킨다. 이러한 결과는 일차적으로 근 소포체의 기능이 완성되어진 상태에서 세포질내의 Na^+ 농도를 증가시키면, 자극 빈도 증가에 따라 Ca^{2+} 배출이 증가하여, 수축을 촉발시키는 Ca^{2+} 농도의 감소가 초래되었음을 의미한다 하겠다. 더우기, 영양액내의 Na^+ 과 Ca^{2+} 을 배제하여 Na^+-Ca^{2+} 교환 기전을 봉쇄할 경우 0.1 Hz에서의 최대 수축 장력에 대한 1 Hz에서 최대 수축 장력의 감소 비율이 다른 연령군의 절반으로 떨어져서 10%정도밖에 되지않는 점으로 미루어 보아, 수축 빈도가 증가하면 정방향 Na^+-Ca^{2+} 교환에 의한 Ca^{2+} 유출이 증가하는 것은 사실인 것으로 믿어진다. 한

걸음 더 나아가, monensin 처치로 세포질내의 Na^+ 농도가 증가되면, 역방향 Na^+-Ca^{2+} 교환에 의한 Ca^{2+} 유입은 오히려 증가할 것이고, 이로 인해 세포내 Ca^{2+} 농도는 증가될 것이므로, 실제 Ca^{2+} 유출량은 본 실험과 같이 수축력의 변동에 비추어 예상하는 정도보다 훨씬 더 클 것이다.

Shattock 및 Bers(1989)는 흰쥐 심근의 경우 활성 전압 기간이 짧고, 세포질내의 유리 Na^+ 농도가 토끼등의 다른 종에 비해 높기 때문에 Na^+-Ca^{2+} 교환을 통한 Ca^{2+} 의 이동 방향을 결정하게 되는 E_{Na-Ca} 이 수축기 동안에는 막전위보다 더 음전위(more negative)를 띄게되고, 이완기 동안에는 막전위가 E_{Na-Ca} 보다 더 음전위를 띄게되어, Na^+-Ca^{2+} 교환을 통해 수축기 동안에는 Ca^{2+} 의 유출이, 이완기 동안에는 Ca^{2+} 의 유입이 일어나게 된다고 주장하였다. 이러한 사실은 Negretti등(1995)에 의해서도 voltage clamping 실험을 통해 입증되었다. 그러므로, 이러한 주장이 사실이라면 흰쥐 심근의 경우에는 수축기 동안에 근 소포체에서 유리되는 Ca^{2+} 이 바로 Na^+-Ca^{2+} 교환을 통해 배출될 수 있는 가능성을 상상할 수 있다. 더욱이 근래에는 Na^+-Ca^{2+} 교환을 통해서만 이동되는 특수 구획(compartment)이 존재하는 것으로 보고(Langer & Rich, 1992; Wang et al, 1996)되고 있으며, 이러한 특수 구획은 t-tubule의 세포막하 부위에 존재하고, 근소포체의 Ca^{2+} 유리를 담당하는 족형 돌기(foot process)를 포함하고 있는 것으로 제시되고 있으므로(Langer 및 Rich, 1992; Langer et al, 1993), 이러한 현상이 나타날 수 있는 가능성은 매우 높으리라 판단된다.

한편, 흰쥐 심근에서 수축 빈도가 빨라짐에 따라 수축력이 감소되어 역사다리 효과가 나타나는 것으로 보아, 적어도 수축력을 결정짓게되는 세포질내의 수축기 유리 Ca^{2+} 농도의 감소가 나타났을 것은 부인할 수 없는 사실이다. 그러므로 흰쥐 심근세포는 타종에 비해 원래 Na^+ 농도가 높은 상태(Shattock & Bers 1989)에서, 수축 빈도가 증가함에 따라 세포질내의 Na^+ 농도가 증가(Jelics & Gupta, 1994; Lostan et al, 1995)하게되어, 심근세포내의 Na^+ 농도가 더욱 높아져 E_{Na-Ca} 을 변동시키게 될 것이다. 그 결과 Na^+-Ca^{2+} 교환의 이동 방향이 앞서 언급한 Shattock 및 Bers(1989)의 주장과 같은 기전에 의해 수축기 동안에 Ca^{2+} 의 유출을 증가시키는 방향으로 조정되어지고, 해부학적으로 매우 가깝다는 사실(Langer & Rich, 1992; Langer et al, 1993)로인해 근 소포체에서 수축기 동안에 유리되는 Ca^{2+} 을 즉시 유출시키게되고 결과 수축기 Ca^{2+} 농도를 낮추게되는 것으로 짐작할 수 있다. 이러한 가정을 바탕으로 monensin 결과나, Na^+ 및 Ca^{2+} 배제 결과를 분석하여 보면 잘 맞아 떨어지는 것을 알 수 있다.

즉 생후 4주군에서는 근 소포체의 기능이 완성되어, 생후 1일, 3일 및 1주군에 비해, 근 소포체로부터 Ca^{2+} 유리량은 증가되어지고, 이렇게 증가된 근 소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 은 수축 빈도가 증가함에 따라 활성이 증가된 정방향 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 통해 수축기 동안에 세포밖으로 더 많은 양이 유출됨으로 수축력은 감소하게 된다. 또한 monensin 투여로 세포질내의 Na^+ 농도가 증가되면, Shattock 및 Bers(1989)의 주장에 비추어 볼 때 수축기 동안에 ENa-Ca 이 막전위보다 더욱더 음전위를 띄게되어 정방향 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 통한 근소포체 유리 Ca^{2+} 의 유출이 생후 4주군에서, 즉 근 소포체 기능이 성숙되어진 후에야 비로소 충분히 증가되어 수축력의 감소가 가중된다고 해석할 수 있다. 그러나, 아직은 이러한 해석을 완전히 인정하기에는 뒷받침할 만한 증거들이 부족한 실정이며, 특히 빈도 증가시 흰쥐 심근 세포내의 Ca^{2+} 농도도 증가되었다는 보고(Field et al, 1996)는 이러한 가설을 전면적으로 부인할 수 있는 결과이므로, 앞으로 계속 추구하여야 할 과제로 생각된다.

본 연구결과들로 미루어보아, 흰쥐 심근에서는 수축 빈도가 감소할수록 수축 운동이 외부 Ca^{2+} 보다는 내부 Ca^{2+} 즉 근 소포체에서 유리되는 Ca^{2+} 에 의해 유발되는 것을 알 수 있다. 또한 본 연구 결과들은 근 소포체의 Ca^{2+} 유리와 Na^+ - Ca^{2+} 교환을 통한 Ca^{2+} 유출기전 사이에 밀접한 연관 관계(Bers & Bridge, 1989; Callewaert et al, 1989; Negretti et al, 1995)가 존재하는 것을 시사하고 있다. 이 두 기전간의 연관 관계란 해부학적 위치로 인해 심근 수축에 가장 밀접한 영향을 미치게되는 근 소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 을 Na^+ - Ca^{2+} 교환이 선택적으로 유출하게 됨을 의미한다 하겠다. 특히 이러한 Ca^{2+} 유출의 증가는 수축 빈도가 증가할수록 더욱 현저하여져서 수축력을 감소시키는 것으로 믿어진다. 그러므로, 흰쥐 심근의 자극 빈도에 따른 역사다리 효과는 수축 빈도가 증가함에 따라 근 소포체에서 유리되는 Ca^{2+} 이 정방향 Na^+ - Ca^{2+} 교환 기전을 통해 더 많이 세포밖으로 유출됨으로 인해 수축력이 감소하게 되어 발현된다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 연세대학교 학술 연구비의 보조로 이루어졌음.

참 고 문 헌

Agata N, Tanaka H, Shigenobu K. Possible action of cyclo-

piazonic acid on myocardial sarcoplasmic reticulum: inotropic effects on neonatal and adult rat heart. *Br J Pharmacol* 108: 571-572, 1993

Bers DM, Bridge JHB. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum Ca-pump: Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res* 65: 334-342, 1989

Bers DM, Christensen DM. Functional interconversion of rest decay and ryanodine effects in rabbit and rat ventricle depends on Na/Ca exchange. *J Mol Cell Cardiol* 22: 715-723, 1990

Blaustein MP. The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 70: 32-82, 1974

Callewaert G, Cleemann L, Morad M. Caffeine-induced Ca^{2+} release activates Ca^{2+} extrusion via Na^+ - Ca^{2+} exchanger in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 257: C147-C152, 1989

Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 56: 395-433, 1987

Chapman RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 245: H535-H552, 1983

Chin TK, Friedman WF, Klitzner TS. Developmental changes in cardiac myocyte calcium regulation. *Circ Res* 67: 574-579, 1990

Demaurex N, Lew DP, Krause KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca^{2+} stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem* 267: 2318-2324, 1992

Field ML, Azzawi A, Unitt JF, Seymour AML, Henderson C, Radda GK. Intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ staircase in the isovolumic pressure-frequency relationship of Langendorff-perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 28: 65-77, 1996

Fozzard HA. Heart: Excitation-Contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 39: 201-220, 1977

Frampton JE, Orchard CH, Boyett MR. Diastolic, systolic and sarcoplasmic reticulum $[\text{Ca}^{2+}]$ during inotropic interventions in isolated rat myocytes. *J Physiol* 437: 351-375, 1991

Harrison SM, Boyett MR. The role of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger in the rate-dependent increase in contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 482: 555-566, 1995

Jelicks LA, Gupta RK. Nuclear magnetic resonance measurement of intracellular sodium in the perfused normotensive and spontaneously hypertensive rat heart. *Am J Hypertens* 7: 429-435, 1994

Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig *J Physiol* 384: 199-222, 1987

- Klitzner T, Morad M. The effects of Ni^{2+} on ionic currents and tension generation in frog ventricular muscle. *Pflugers Arch* 398: 267–273, 1983
- Langer GA, Rich TL. A discrete Na-Ca exchange-dependent Ca compartment in rat ventricular cells: exchange and localization. *Am J Physiol* 262: C1149–C1153, 1992
- Langer GA, Peskoff A, Post JA. How does the Na^+ - Ca^{2+} exchanger work in the intact cardiac cell? *J Mol Cell Cardiol* 25: 637–639, 1993
- Lostan CS, Miller SK, Simor T, Elgavish GA. Cardiac staircase and NMR-determined intracellular sodium in beating rat hearts: *Am J Physiol* 269: H332–H340, 1995
- Nagasaki K, Fleischer S. Ryanodine sensitivity of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 9: 1–7, 1988
- Negretti N, Varro A, Eisner DA. Estimate of net calcium fluxes and sarcoplasmic reticulum calcium content during systole in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 486: 581–591, 1995
- Olivetti G, Anversa P, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the isolated rat atria. *Experientia* 33: 1611–1612, 1980
- Shattock MJ, Bers DM. Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256: C813–C822, 1989
- Tanaka H, Shigenobu K. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: Developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1305–1313, 1989
- Vonaren M. Force-frequency relationship, contraction duration and recirculating fraction of calcium in postnatally developing rat heart ventricles: correlation with heart rate. *Acta Physiol Scand* 145: 311–321, 1992
- Wang SY, Peskoff A, Langer GA. Inner sarcolemmal leaflet Ca^{2+} binding: its role in cardiac Na/Ca exchange. *Biophys J* 70: 2266–2274, 1996
- Wier WG. Cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ in mammalian ventricle: Dynamic control by cellular processes. *Ann Rev Physiol* 52: 467–485, 1990
- Wolska BM, Lewartowski B. The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the Ca^{2+} extrusion from the resting myocytes of guinea-pig heart: comparison with rat. *J Mol Cell Cardiol* 25: 75–91, 1993
- Woodworth RS. Maximal contraction, “staircase” contraction, refractory period and compensatory pause of the heart. *Am J Physiol* 8: 213–249, 1902
-