

## 백서 심실 근세포 L형 $Ca^{2+}$ 전류에 대한 유체압력의 효과

이선우 · 우선희\*

충남대학교 약학대학

(Received February 8, 2006; Revised March 10, 2006)

### Effect of Fluid Pressure on L-type $Ca^{2+}$ Current in Rat Ventricular Myocytes

Sunwoo Lee and Sun-Hee Woo\*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** — Cardiac chambers serve as mechanosensory systems during the haemodynamic or mechanical disturbances. To examine a possible role of fluid pressure (FP) in the regulation of atrial  $Ca^{2+}$  signaling we investigated the effect of FP on L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca}$ ) in rat ventricular myocytes using whole-cell patch-clamp technique. FP (~40 cm  $H_2O$ ) was applied to whole area of single myocytes with electronically controlled micro-jet system. FP suppressed the magnitude of peak  $I_{Ca}$  by  $\approx 25\%$  at 0 mV without changing voltage dependence of the current-voltage relationship. FP significantly accelerated slow component in inactivation of  $I_{Ca}$ , but not its fast component. Analysis of steady-state inactivation curve revealed a reduction of the number of  $Ca^{2+}$  channels available for activity in the presence of FP. Dialysis of myocytes with high concentration of immobile  $Ca^{2+}$  buffer partially attenuated the FP-induced suppression of  $I_{Ca}$ . In addition, the intracellular  $Ca^{2+}$  buffering abolished the FP-induced acceleration of slow component in  $I_{Ca}$  inactivation. These results indicate that FP suppresses  $Ca^{2+}$  currents, in part, by increasing cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration.

**Keywords** □ fluid pressure (FP), L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca}$ ), ventricular myocytes, whole-cell patch clamp,  $Ca^{2+}$  buffer

심근세포의 수축은 세포질  $Ca^{2+}$ 의 일시적인 증가에 의해 이루어진다. 세포질  $Ca^{2+}$  농도의 증가는 활동전위 시에 열리는 L형  $Ca^{2+}$  채널(dihydropyridine receptor, DHPR)을 통해 유입되는  $Ca^{2+}$ 이 근소포체(sarcoplasmic reticulum) 막에 있는 라이아노딘 수용체(RyR)를 자극할 때, RyR를 통해 근소포체에서 세포질로  $Ca^{2+}$ 이 과량 유리됨으로써 이루어진다.<sup>1-4)</sup> 유리된  $Ca^{2+}$ 은 다시 근처 세포막에 있는 DHPR을 불활성화(inactivation) 시키고, 이에 의해 일련의  $Ca^{2+}$ -유도성  $Ca^{2+}$  유리( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release, CICR) 과정이 종결된다.<sup>5,6)</sup>

심장의 수축과 부피 및 압력의 변화에 의한 심장의 기계적 환경변화는 심장의 흥분성과 수축력을 변화시킨다고 알려져 있다.<sup>7-9)</sup> 밸브질환, 고혈압 등의 병적인 조건에 처하면 심장의 기계적 또는 혈액동력학적 장애가 발생하여 부정맥과 심장비대증이 발생한다.<sup>10-12)</sup> 그럼에도 불구하고 기계적 자극을 심장 근세

포가 어떻게 인지하여 세포내 기능의 변화를 일으키는 지에 대한 분자신호체계는 아직 분명치 않다. 이러한 측면에서 기계적 자극에 의한 심방 근세포  $Ca^{2+}$  신호나  $Ca^{2+}$  전류( $I_{Ca}$ )의 변화양상에 대한 기존의 선행연구들이 있으나, 그 결과가 일관되지 않고 여전히 논란의 대상이 되고 있다. 예를 들어, 불에 달군 작은 유리 막대로 사람 심방 근세포를 길이 방향으로 늘였을 때  $I_{Ca}$ 는 감소되었으나,<sup>13)</sup> Sasaki *et al.*은 기니픽 심실 근세포를 유리바닥에 고정시킨 후, patch-pipette으로 세포막을 흡입할(음의 압력) 때 세포막  $I_{Ca}$  변화의 일정한 경향을 관찰할 수 없었다고 보고하고 있다.<sup>14)</sup> 반면, patch-pipette으로 토끼 심방 근세포에 양의 압력을 가하면  $I_{Ca}$ 가 증가한다는 보고도 있다.<sup>15)</sup> 반면, 토끼 심실 근세포의 외부에 저장액을 처리하여 세포를 부풀리면 초기에는  $I_{Ca}$ 가 조금 증가하지만 후기에는 70% 이상 감소한다는 보고가 있다.<sup>16)</sup> 이러한 실험 결과의 다양성에 대한 원인은 분명하지 않지만, 한 가지 가능성은 단일 심근세포에서 기계적 자극을 일으키는 방법이 연구자들에 따라 다소 차이가 있다는 점이다. 대부분의 연구자들은 세포에 patch-clamp 용 미세전극이나 다른 모세관을 부착시켜 세포의 길이를 직접적으로 신장(stretch) 시키

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-821-5924 (팩스) 042-823-6566  
(E-mail) shwoo@cnu.ac.kr

거나,<sup>13,17,18</sup> patch 전극으로 압력을 세포막 국부지역에 가하는 방법을 사용하거나,<sup>14,15</sup> 세포외부에 저장액(hypotonic solution)을 처리하여 세포 크기를 늘리는 방법(swelling)<sup>16</sup>으로 기계적 자극을 가한다. 그러나 이러한 방법은 자극 이외에, 사용된 도구나 삼투압 변화에 의해 발생하는 효과가 부가적으로 나타난다는 단점이 있다. 본 연구자들은 최근 유체 압력(fluid pressure, FP)을 단일 심근세포에 가하였을 때 세포질  $Ca^{2+}$  농도가 증가함을 보고한 바 있다.<sup>19</sup> 이는 유체 압력 자체가 심근세포 기능을 변화시킬 수 있음을 나타낸다. 세포질  $Ca^{2+}$  농도 변화는  $Ca^{2+}$  전류에도 영향을 미칠 수 있으므로<sup>5,6</sup> 본 논문에서는 이에 대한 가능성을 고찰하고자 하였고, 궁극적으로 유체 압력이 심근세포  $Ca^{2+}$  signaling을 어떻게 조절하는지에 대한 이해를 돕고자 하였다.

## 실험 방법

### 단일 심실 근세포의 분리

심실 근세포의 분리는 Woo *et al.*<sup>20</sup>의 방법으로 시행하였다. 간단히 요약하면, 백서 수컷(Sprague Dawley, 체중 200~300 g)을 sodium pentobarbital(150 mg/kg, 복강 투여)로 마취한 후 심장을 적출하였다. 심장의 대동맥을 Langendorff 관류 장치의 cannular에 연결하여 고정된 후, 대동맥 안으로 0 mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액((단위 : mM) 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, pH=7.3)을 36.5°C에서 3분간 관류시켰다. 그 후 0 mM  $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에 collagenase(1.4 mg/ml, Type 1, Roche)와 protease(0.14 mg/ml, Type XIV, Sigma)를 포함한 용액을 12분간 관류시키고, 마지막으로 0.2 mM  $[Ca^{2+}]$ 을 포함한 Tyrode 용액을 8분간 관류시켜 사용된 효소를 제거하였다. 심장을 Langendorff 장치로 부터 분리한 후 심실을 취하여, 여러 조각으로 나눈 후, 조직을 흔들어서 세포들이 떨어져 나오도록 하였다. 분리한 세포는 실험에 사용하기 전까지 실온에서 0.2 mM  $[Ca^{2+}]$ 을 포함한 Tyrode 용액에 보관하였다.

### 유체 압력 처리

유체압력을 단일세포에 처리하도록 장치를 자체 고안하여 사용하였다. 약 400  $\mu$ m 지름을 갖는 미세관을 높이 약 40 cm 위치에 놓인 용액 저장고에 연결하고, 미세관의 끝은 micromanipulator를 이용하여 현미경 하에서 단일세포 옆 약 150  $\mu$ m 건너편에 한 쪽 끝부분이 바닥에 닿도록 비스듬히 위치시켰다. 세포와 미세관 끝의 간격을 항상 일정하게 유지하기 위하여, 40배 대물렌즈에 눈금자를 삽입하여 간격의 길이를 확인하였다. 세포 외액과 동일한 용액을 저장고 및 미세관의 끝부분까지 채우고 용액의 흐름은 평소 정지 상태에 둔다. 용액의 일시적인 방출은 전기 스위치 장치를 이용하였고, 그 처리 시점과 지속 시간을 컴퓨터

프로그램(pClamp 9, Axon Instruments)으로 조절하였다. 이 때 방출되는 유체의 힘은 약 30 dyne/cm<sup>2</sup>에 해당된다. Patch-clamp와 동시에 세포에 유체 압력을 적용하였으며, 동시에 다른 실험 변수들을 기록하였다.

### Whole-cell patch-clamp

분리한 단일 심실 근세포에 whole-cell patch-clamp<sup>21</sup>를 시행하여  $I_{Ca}$ 를 측정하였다. Patch-clamp에 사용된 세포 내액은(단위: mM) 110 CsCl, 20 TEA-Cl, 20 HEPES, 5 Mg-ATP, 2 EGTA (CsOH를 이용하여 pH를 7.2로 보정)를 포함하는 용액으로, 전극에 이 용액을 채운 후 기록되는 저항은 약 2.5~3 M $\Omega$ 이었다. Patch-clamp에 사용된 전극은 two-step vertical puller(model PP-830, Narishige, Japan)로 제작되었다. 전류의 측정은 patch-clamp amplifier(EPC 7, HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)로 시행하였고, A/D converter(model Digidata 1322, Axon Instruments, Inc., CA, USA)와 컴퓨터 소프트웨어(pCLAMP 9.0, Axon Instruments, Inc., CA, USA)를 사용하여 특정 전압 고정 프로토콜을 적용하고 동시에 데이터를 기록하였다. 측정된 전류는 10 kHz로 필터하였다.

$Ca^{2+}$  전류의 기록을 위해 K<sup>+</sup> 전류는 2 mM  $Ca^{2+}$ 을 포함한 정상 Tyrode 용액(세포 외액, pH=7.4)에서 K<sup>+</sup>을 없애고, 세포 내액에 TEA<sup>+</sup>를 첨가함으로써 억제하였고, Na<sup>+</sup> 전류는 막전압을 -40 mV에 고정하여 불활성화시켰다. 실험은 실온 상태(22~24°C)에서 수행하였다.

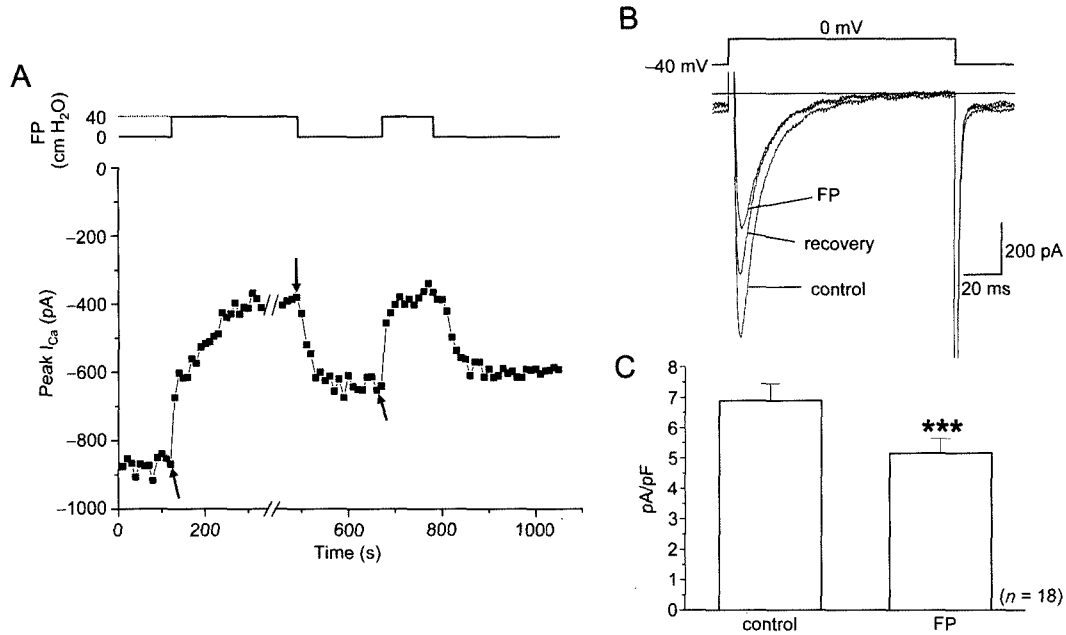
### 데이터 분석

$I_{Ca}$ 의 분석은 Clampfit 9.0(Axon Instruments, Inc., CA, USA) 컴퓨터 소프트웨어로 시행하였다. Steady-state inactivation 곡선 및  $I_{Ca}$  곡선의 분석은 Origin 6.0(Microcal, Northampton, MA) 컴퓨터 프로그램으로 시행하였다. 실험 데이터는 평균± 표준오차로 표시하였으며, "n"은 실험에 사용된 세포의 개수를 나타낸다. 통계적 유의성은 paired Student's *t* test를 사용하여 검증하였고,  $P < 0.05$ 인 경우에 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 유체 압력에 의한 peak $I_{Ca}$ 의 감소

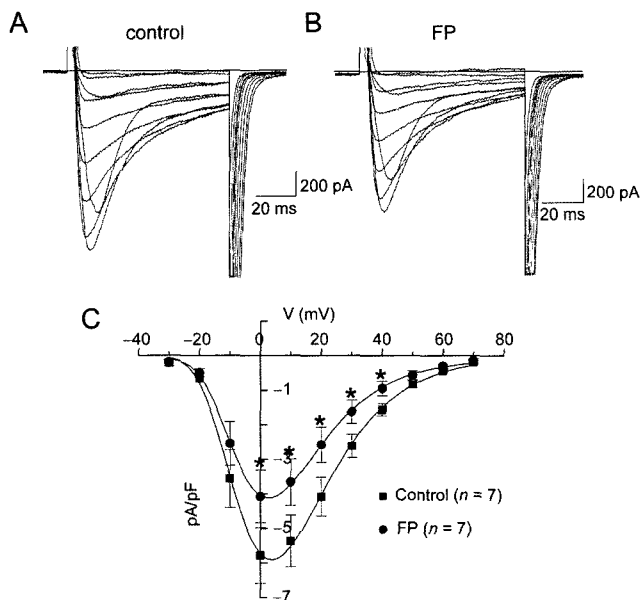
단일 심실 근세포에 whole-cell patch를 만든(형성한) 후, 막전압을 -40 mV에 고정하고 전압을 120 ms 동안 10초에 한번씩 0 mV로 탈분극 시켰을 때 관찰되는  $I_{Ca}$ 를 기록하였다. 전극 내 용액이 충분히 세포내로 투석되도록 하기 위해, 세포막 rupture 후 약 5분이 경과한 후에  $I_{Ca}$ 의 측정을 시작하였다. Fig. 1A는 측정된  $I_{Ca}$ 의 peak 값을 시간에 대한 그래프로 나타낸 것으로, 유



**Fig. 1** – Effect of fluid pressure (FP) on I<sub>Ca</sub> in rat ventricular myocytes. (A) Time course of the effect of FP on peak I<sub>Ca</sub>. Arrows indicate time points when the representative currents in the panel B were selected. (B) Voltage pulse protocol (upper panel) and superimposed current tracings recorded in control condition, in the presence of FP and after stopping the fluid puffing (FP) (recovery) (lower panel). (C) Mean effect of FP on peak I<sub>Ca</sub> density (pA/pF) at 0 mV. \*\*\*P<0.001 vs. control. n indicates the number of cells tested.

체 압력(FP)을 가한 후 I<sub>Ca</sub>가 점차 감소됨을 보여준다. 이 유체 압력 효과는 약 90.0±6.97초(n=18) 후에 안정화되었다. 유체 압

력 처리(용액의 일시적 방출)를 중단하면 다시 I<sub>Ca</sub>는 회복되었으며, 반복적인 처리에도 동일한 I<sub>Ca</sub> 억제 효과가 나타났다(Fig. 1A). Fig. 1B는 유체 압력을 처리하기 전과 후에 기록된 대표적인 I<sub>Ca</sub>(Fig. 1A, 화살표)를 겹쳐놓은 것으로, 유체 압력에 의한 I<sub>Ca</sub> 감소를 보여준다. 유체 압력은 0 mV에서 기록되는 I<sub>Ca</sub> 밀도(pA/pF)를 6.89±0.55에서 5.15±0.50(n=18, P<0.001)로 약 25% 감소시켰다(Fig. 1C).



**Fig. 2** – Effect of FP on voltage dependence of I<sub>Ca</sub> (A and B). Superimposed current traces recorded during depolarizing pulses to -30~+70 mV with 10 mV increments from holding potential of -40 mV in the absence (A) and presence (B) of FP. (C) Current-voltage relation of peak I<sub>Ca</sub> in control condition and under FP. \*P<0.05 vs. control.

유체 압력에 의한 I<sub>Ca</sub> 감소가 세포막 전압에 의해 조절되는 지 알아보기 위해, 여러 전압에서 유체 압력에 의한 효과를 조사하였다(Fig. 2). -40 mV에 전압을 고정하고 -30에서 +70 mV까지 10 mV 간격으로 탈분극 자극을 세포에 가하여 기록되는 대표적인 전류는 Fig. 2A와 같다. 유체 압력 처리 약 90초 후 전과 동일하게 자극을 주어 Fig. 2B의 전류를 얻었다. 관찰된 전류-전압 관계는 전형적인 L형 Ca<sup>2+</sup> 채널의 종(bell) 모양 전압 의존성을 나타내었다(Fig. 2A, 2B). 유체 압력을 가한 후 대부분의 전압에서 현저한 억제 효과가 나타났으며, 전류-전압 관계 곡선의 이동성은 관찰되지 않았다(Fig. 2C).

**I<sub>Ca</sub> inactivation에 대한 유체 압력의 효과**

I<sub>Ca</sub>의 inactivation이 유체 압력에 의하여 조절되는 지 알아보기 위해 0 mV에서 기록한 I<sub>Ca</sub>의 inactivation 부분을 [식 1]로 fitting하여 fast component와 slow component의 time constant (τ)를 각각 조사하였다.

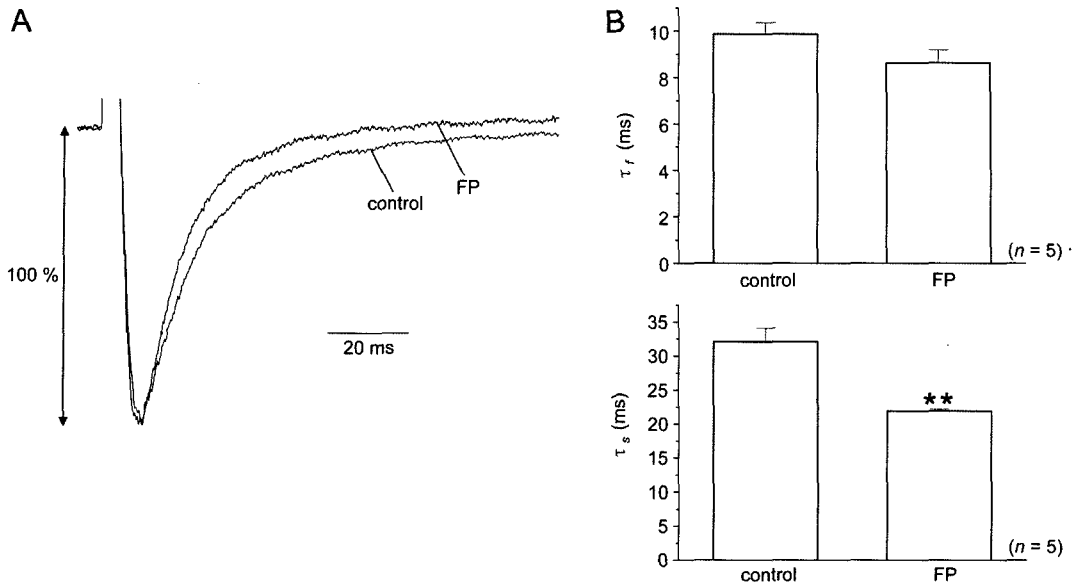


Fig. 3 – Effect of FP on inactivation kinetics of  $I_{Ca}$ . (A)  $I_{Ca}$  traces obtained at 0 mV in the absence and presence of FP were normalized to their peaks and superimposed. (B) Comparison of time constants of fast (upper panel) and slow (lower panel) components of  $I_{Ca}$  inactivation. \*\* $P < 0.01$  vs. control.

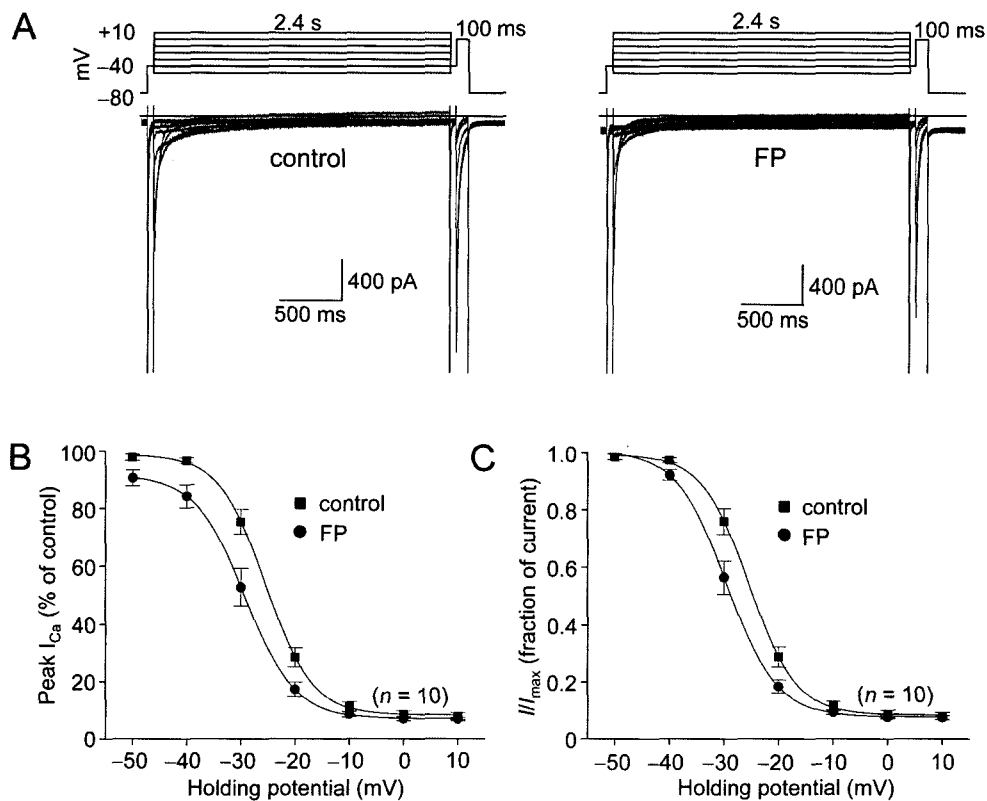


Fig. 4 – Effect of FP on the steady-state inactivation of  $I_{Ca}$ . (A) Upper panels show voltage protocol and lower panels represent currents simultaneously obtained during the voltage step pulses in the absence (left) and presence of FP (right). Measurement of steady state inactivation was carried out by applying prepulses to produce voltages ranging from -50 to +10 mV for 2.4 s from an holding potential of -40 mV, followed by a test pulse to 0 mV for 100 ms. (B and C) Effect of FP on the voltage dependence of  $I_{Ca}$  availability. Steady-state inactivation curves were obtained before (square) and after (circle) exposure to FP. The peak amplitude of test pulse current was then plotted against the prepulse voltage. The individual peak currents were normalized to the peak  $I_{Ca}$  amplitude obtained in the absence of FP at -50 mV (B) or normalized to maximal current ( $I_{max}$ ) (C). Plots, mean  $\pm$  SE of 10 cells.

$$I(t) = I_{\infty} + I_f \exp(-t/\tau_f) + I_s \exp(-t/\tau_s) \quad \text{[식 1]}$$

이 식에서,  $I_{\infty}$ 는 전류가 steady-state에 도달하였을 때의 전류 크기이며,  $I_f$ 와  $I_s$ 는 fast component와 slow component가 시작되는 시점의  $I_{Ca}$ 의 크기를 각각 나타낸다. 유체 압력은  $I_{Ca}$ 의 inactivation 중 slow component를 가속화시켰으나 fast component에는 현저한 효과가 없었다(Fig. 3).

Ca<sup>2+</sup> 채널의 유효도(availability)는 전압 의존성을 갖는데 이러한 전압 의존성에 대한 유체 압력의 효과를 조사하였다.  $I_{Ca}$ 의 steady-state inactivation 정도를 double-pulse 전압 고정 프로토콜(Fig. 4A, upper traces)을 20초에 한번씩 세포에 가하여 기록된 전류곡선(Fig. 4A, lower traces)을 분석하여 고찰하였다(Fig. 4). 즉, 먼저 세포를 -50에서 +10 mV로 10 mV씩 올리면서 2.4 초간 고정된 후, 0 mV로 100 ms 동안 탈분극시킬 때 활성화되는 전류를 기록하였다. Fig. 4B는 각 고정전압(holding potential)에 대하여 두 번째 펄스 즉 0 mV에서 활성화된  $I_{Ca}$ 의 크기를 control과 비교하여 %로 나타난 그래프이고, Fig. 4C는 0 mV에서 활성화된  $I_{Ca}$ 의 최대값에 대한 비를 고정전압에 대하여 나타낸 것이다. Fig. 4C의 곡선은 Boltzmann 함수[식 2]로 fitting 한 후 얻어진 것이다.

$$I/I_{max} = \{1 + \exp[(V - V_{0.5})/k]\}^{-1} \quad \text{[식 2]}$$

이 식에서  $V_{0.5}$ 는 전류가 절반이 될 때의 막전압을 나타내고,  $k$ 는 곡선의 기울기를 나타낸다. 유체 압력을 가하기 전과 후에 기록된 전류들을 각각 fitting한 후에 얻어진  $V_{0.5}$  값은 각각 -25.4 ± 0.90 mV, -29.3 ± 1.06 mV(n=10, P<0.001)로 차이를 나타내었

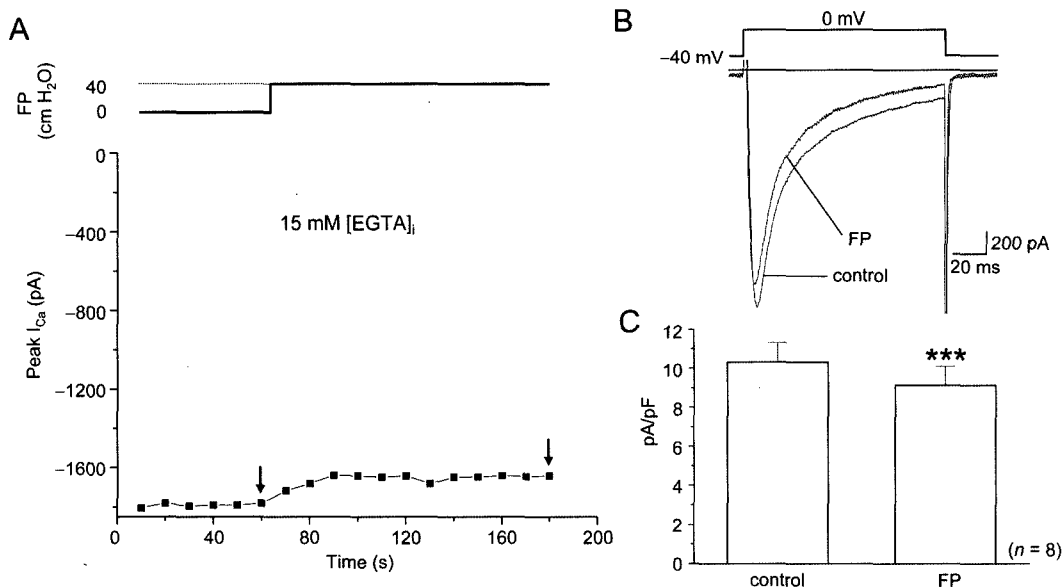
으나,  $k$  값은 유사하였다(control, 3.91 ± 0.16; FP, 4.12 ± 0.10, n=10, P>0.05). 이 결과는 유체 압력에 의하여 활성을 나타내는 Ca<sup>2+</sup> 채널의 수가 감소함을 나타낸다.

**EGTA를 투석한 심실 근세포의  $I_{Ca}$ 에 대한 유체 압력 효과**

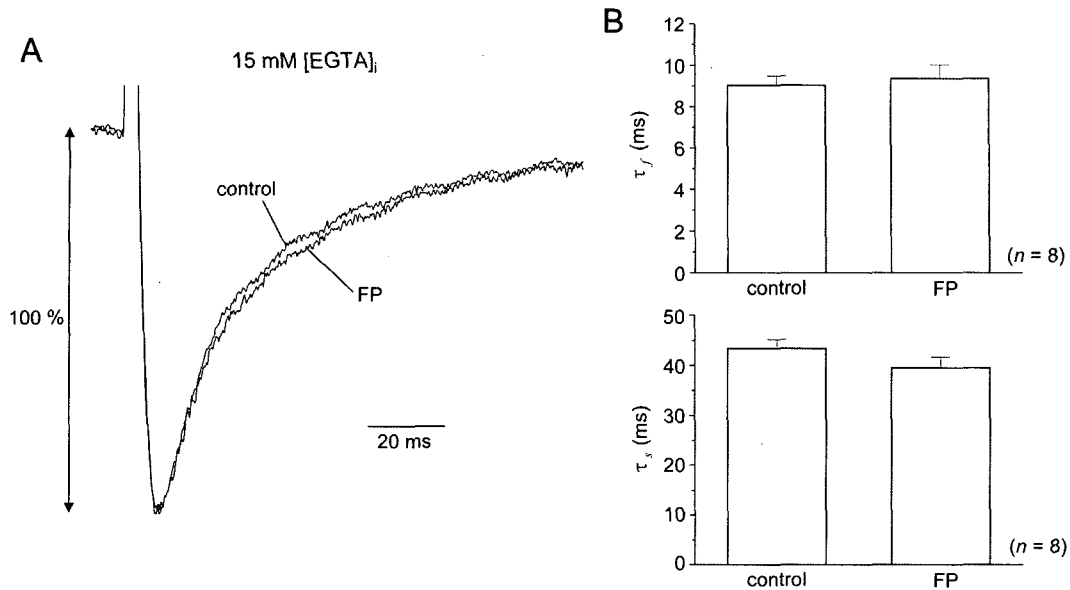
유체 압력은 심근세포 내 휴지기 Ca<sup>2+</sup>을 일시적으로 증가시킨다.<sup>19)</sup>  $I_{Ca}$ 에 의해 야기되는 근소포체로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리 후, 유리된 Ca<sup>2+</sup>은 다시 세포막 Ca<sup>2+</sup> 채널의 inactivation을 약 60% 담당한다.<sup>6)</sup> 또한 휴지기 세포질 Ca<sup>2+</sup> 농도 또한 Ca<sup>2+</sup> 채널에 영향을 미친다고 알려져 있다. 유체 압력에 의한  $I_{Ca}$  감소가 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 증가에 의해 일어나는 지 알아보기 위해 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화를 저해하는 강력한 부동성 Ca<sup>2+</sup> 완충제인 EGTA를 고농도(15 mM)로 세포내에 투석시킨 후, 유체 압력이  $I_{Ca}$ 에 여전히 영향을 미치는지 조사하였다.

15 mM EGTA를 투석한 심실 근세포에서도 유체 압력에 의해 여전히  $I_{Ca}$ 가 현저히 감소하였으나, 그 감소 정도는 약 10%로 나타나서(Fig. 5), 2 mM EGTA를 투석하였을 때의 유체압력 효과(Fig. 1C) 보다 낮았다.

유체 압력에 의한  $I_{Ca}$  inactivation 조절 효과가 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가에 의해 일어나는지 조사하기 위해, 역시 15 mM EGTA를 투석한 세포에서 얻어진  $I_{Ca}$ 의 inactivation kinetics를 고찰하였다.  $I_{Ca}$ 의 inactivation time constant를 위에서 언급한 방법과 동일하게 분석하였을 때, 15 mM EGTA를 투석한 세포에서는 fast 및 slow component 모두 유체 압력에 의해 변화되지 않았다(Fig. 6). 이 결과들은 유체 압력에 의한  $I_{Ca}$ 의 억제 및 inactivation slow



**Fig. 5** – Effect of FP on  $I_{Ca}$  in highly Ca<sup>2+</sup>-buffered myocytes. (A) Time course of the effect of FP on peak  $I_{Ca}$  measured in cells dialyzed with 15 mM EGTA-containing internal solution. (B) Representative currents recorded before (control) and after (FP) applying FP (see arrows in panel A). (C) Mean effect of FP on peak  $I_{Ca}$  density in the highly Ca<sup>2+</sup>-buffered myocytes. \*\*\*P<0.001 vs. control.



**Fig. 6** – Effect of FP on inactivation of  $I_{Ca}$  in highly  $Ca^{2+}$ -buffered myocytes. (A)  $I_{Ca}$  traces obtained in the absence and presence of FP were normalized and superimposed. (B) The average time constants of fast (upper panel) and slow (lower panel) components of  $I_{Ca}$  inactivation were compared between the control and FP in 8 highly  $Ca^{2+}$ -buffered myocytes.

phase의 가속화가 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 증가에 의해 발생함을 나타낸다. 고농도의 EGTA에 의해서 유체압력의  $I_{Ca}$  억제효과가 완전히 제거되지 않았으므로, 유체압력이 세포 내  $Ca^{2+}$  농도 변화 이외의 다른 기전에 의해  $I_{Ca}$ 를 억제할 가능성은 여전히 남아있다.

## 결론

이 논문에서는 유체 압력에 의해 L형  $Ca^{2+}$  전류가 억제됨을 증명하였는데, 이는 심근세포가 유체 압력을 감지하는 기전을 갖고 있음을 나타낸다. 유체압력에 의한  $Ca^{2+}$  전류 크기의 감소 효과에 대한 세포내 기전은 앞으로 자세히 연구가 되어야 하겠지만, 본 연구에서는 그 신호전달 기전에 세포내  $Ca^{2+}$ 의 증가가 관여함을 입증하였다.  $Ca^{2+}$  전류의 감소는 심근세포 활동전위의 변화 및 수축력의 감소를 일으킬 수 있고,<sup>22)</sup> 이에 대한 자세한 연구도 앞으로 진행되어야 할 부분이다. 본 연구결과를 심장내의 혈액 동력학적 장애 및 기계적 마찰로 야기될 수 있는 유체압력이 직접적으로 심근세포의  $Ca^{2+}$  signaling에 영향을 주어 심각한 심부전을 야기할 가능성이 있음을 나타낸다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2004-041-E00017) 및 과학재단 시스템생물학연구사업(M10503010001-05N0301-00113)의 지원을 받아 수행된 연구임.

## 참고문헌

- 1) Beuckelmann, D. J. and Wier, W. G. : Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cell. *J. Physiol.* **405**, 233 (1998).
- 2) Näbauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. : Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* **244**, 800 (1989).
- 3) Niggli, E. and Lederer, W. J. : Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science* **250**, 565 (1990).
- 4) Cleemann, L. and Morad, M. : Role of  $Ca^{2+}$  channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from  $Ca^{2+}$  transients and contraction. *J. Physiol.* **432**, 283 (1991).
- 5) Sham, J. S. K., Cleemann, L. and Morad, M. : Functional coupling of  $Ca^{2+}$  channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 121 (1995).
- 6) Adachi-Akahane, S., Cleemann, L. and Morad, M. : Cross-signaling between L-type  $Ca^{2+}$  channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **108**, 435 (1994).
- 7) Lakatta, E. G. : Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol. Rev.* **73**, 413 (1993).
- 8) Nazir, S. A. and Lab, M. J. : Mechanoelectric feedback and atrial arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* **31**, 52 (1996).
- 9) Kohl, P., Hunter, P. and Noble, D. : Stretch-induced changes in heart rate and rhythm: clinical observations, experiments and mathematical models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 91 (1999).
- 10) Copper, G., Kent, R. L., Uboh, C. E., Thompson, E. W. and

- Marino, T. A. : Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **75**, 1403 (1985).
- 11) Komuro, I., Kaida, T., Shibazaki, Y., Kurabayashi, M., Katoh, Y., Hoh, E., Takaku, F. and Yazaki, Y. : Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J. Biol. Chem.* **265**, 3595 (1990).
- 12) Bode, F., Sachs, F. and Franz, M. R. : Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature* **409**, 14 (2001).
- 13) Kamkin, A., Kiseleva, I., Wagner, K. D., Bohm, J., Theres, H., Gunther, J. and Scholz, H. : Characterization of stretch-activated ion currents in isolated atrial myocytes from human hearts. *Pflügers Arch.* **446**, 339 (2003).
- 14) Sasaki, N., Mitsuiye, T. and Noma, A. : Effects of mechanical stretch on membrane currents of single ventricular myocytes of guinea-pig heart. *Jpn. J. Physiol.* **42**, 957 (1992).
- 15) Matsuda, N., Hagiwara, N., Shoda, M., Kasanuki, H. and Hosoda, S. : Enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.* **78**, 650 (1996).
- 16) Li, G.-R., Zhang, M., Satin, L. S. and Baumgarten, C. M. : Biphasic effects of cell volume on excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **282**, H1270 (2002).
- 17) Ruwhof, C., van Wamel, J. E. T., Noordzij, L. A. W., Aydin, S., Harper, J. C. R. and van der Laarse, A. : Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* **29**, 73 (2001).
- 18) Hongo, K. and LeGuennec, J. Y. : Changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup> current in isolated rat ventricular myocytes following an increase in cell length. *J. Physiol.* **491**, 609 (1996).
- 19) Woo, S. H., Risius, T., Javaheri, A. and Morad, M. : Effect of shear stress on local and focal Ca<sup>2+</sup> signaling and membrane current in rat atrial myocytes. *Biophys. J.* **86**, 107a (2004).
- 20) Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Ca<sup>2+</sup> current-gated focal and local Ca<sup>2+</sup> release in rat atrial myocytes: evidence from rapid 2-D confocal imaging. *J. Physiol.* **543**, 439 (2002).
- 21) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85 (1981).
- 22) Lee, S. Y., Lee, C. O., Morad, M. and Woo, S. H. : Modulation of atrial excitation-contraction coupling by flow-mediated shear stress. *Biophys. J.* **88**, 139a (2005).