

Ca^{2+} 통로 봉쇄제들에 의한 심근 근소포체
 Ca^{2+} 유리 봉쇄작용의 비교

연세대학교 대학원

의 학 과

안 성 완

Ca²⁺ 통로 봉쇄제들에 의한 심근 근소포체
Ca²⁺ 유리 봉쇄작용의 비교

지도 고 창 만 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

안 성 완

안성완의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

부족한 저를 학문의 길로 인도해주시고 본 연구를 진행함에 있어 아낌없는 지도와 세심한 배려를 베풀어 주신 고창만 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 논문내용에 많은 지도와 조언을 해주신 공인덕 교수님과 이승환 교수님께 감사드립니다. 생소한 전기 생리학적 실험에 대해 아낌없는 조언을 해주신 정성우 교수님 그리고 박규상 교수님께 감사드리며 차승규 선생님과 여러 생리학 교실 선생님께 감사드립니다. 그리고 연구의 진행에 있어서 실험동물을 관리해 주신 서상건 선생님과 약리학 교실 선생님들에게도 감사드립니다.

하늘나라에서 기뻐하실 아버님 영전에 이 논문을 바치며 노심초사 둘째 아들을 걱정하시는 어머님과 매형 그리고 누님께 이 지면을 빌어 진심으로 감사드립니다.

많은 망설임 끝에 선택한 이 길에 묵묵히 든든한 후원자가 되어 준 제 아내와 큰딸 지애 그리고 아들 재형 이에게 감사한 마음과 함께 이 논문이 조그만 선물이 되었으면 하는 바람입니다.

2004 년 6 월

저자 씀

차 례

그림차례	ii
국문요약	iii
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	6
2.1. 단일 심근 세포의 분리	6
2.2. 단일 심근 세포에서 막전류 측정	6
2.3. 단일 심근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정	8
2.4. 시약	8
2.5. 자료 분석	9
제3장 결과	10
3.1. Ca^{2+} 전류 봉쇄작용의 비교	10
3.2. Ramp pulse 유발 내향전류에 대한 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 봉쇄작용 비교	13
3.3. 봉쇄제들의 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄작용	17
제4장 고찰	21
제5장 결론	24
참고문헌	26
영문요약	32

그림 차례

제1도. Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 용량 의존적 Ca^{2+} 전류 봉쇄작용의 비교	11
제2도. Ca^{2+} 전류의 전류-전압 관계에 대한 nifedipine($1 \mu\text{M}$) 및 CdCl_2 (0.1 mM)의 봉쇄작용의 비교	12
제3도. BAPTA 세포내 투석이 심실근세포의 막전류 및 세포질내 Ca^{2+} 농도 변동에 미치는 영향	15
제4도. Ramp pulse에 의해 유발된 내향전류에 대한 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 용량 의존적 봉쇄작용의 비교	16
제5도. Ryanodine($10 \mu\text{M}$)의 내향전류 봉쇄작용	19
제6도. 0.1 mM CdCl_2 에 의해 억제되지 않은 내향전류에 대한 10 mM caffeine 의 봉쇄작용	20

국문요약

Ca²⁺ 통로 봉쇄제들에 의한 심근 근소포체 Ca²⁺ 유리 봉쇄작용의 비교

심근에서는 수축에 필요한 활성 Ca²⁺의 대부분을 근소포체로부터 공급받으며, 이 과정은 L-type Ca²⁺ 통로를 통해 유입된 Ca²⁺에 의한 Ca²⁺-유발 Ca²⁺ 유리기전을 통해 이루어진다. 역시 근소포체로부터 필요한 Ca²⁺을 공급받는 골격근의 경우에는 심근과는 달리, Ca²⁺과는 무관하게 탈분극으로 인한 L-type Ca²⁺ 통로의 구조적 변경이 L-type Ca²⁺ 통로와 조직학적으로 연결된 ryanodine 수용체를 기능적으로 개방하여 근소포체로부터 Ca²⁺을 유리시킨다. 골격근의 이러한 기능적 연결은 L-type Ca²⁺ 통로와 ryanodine receptor가 물리적으로 연결되어 있기 때문에 가능하다. 최근에는 그 빈도는 미약하나마 심근 세포에서도 L-type Ca²⁺ 통로와 ryanodine receptor가 서로 연결되어 있어 기능적 연결이 일어날 수 있다는 가능성이 제시되었으나 아직 명확한 규명은 이루어지지 못하고 있다.

이에 본 연구에서는 심근에서 L-type Ca²⁺ 통로와 ryanodine 수용체 사이에 기능적 연결이 존재하는지 여부를 규명하기 위한 일환으로, 흰쥐의 단일 심근 세포에서 전세포 막전압 고정법을 사용하여, 화학 구조가 다르고 L-type Ca²⁺ 통로의 결합 부위가 서로 다른 L-type Ca²⁺ 통로 봉쇄제들과 근소포체의 Ca²⁺ 유리와의 상호 관련성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 화학구조가 상이하고 서로 다른 부위에 결합하여 L-type Ca²⁺ 통로를 봉쇄하는 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들인 nifedipine, verapamil, diltiazem 및 CdCl₂는 막전압을 -40 mV에서 0 mV로 500 ms동안 사다리형 전기 자극으로 유발한 Ca²⁺ 전류를 각각 용량에 비례하여 봉쇄하였으며, 그때 최고 효능의 차이는 나타나지 않았다.

2. 전기 자극을 +100 mV에서 -100 mV로 200 ms에 걸쳐 -1 mV/ms의 속도로 하향시킨 ramp pulse로 전환하여 매 10초 간격으로 자극함에 따라 흰쥐 심근 세포의 막전류는 외향전류에서 내향전류로 전환되었고, 8~12분 후 안정되어 -12.9 ± 0.5 pA/pF를 나타내었다. 전기 자극으로 발생하는 세포내 Ca^{2+} 농도 변화는 BAPTA의 농도에 비례하여 감소하였으며 5 mM 이상에서는 완전히 소실되었다.

3. Nifedipine, verapamil 및 diltiazem은 ramp pulse로 유발되는 내향전류를 용량에 비례하여 억제하였으며 그 최고 효능은 각각 86.2 ± 2.0 %, 82.3 ± 5.1 %, 84.7 ± 3.1 %이었다. 반면, $CdCl_2$ 의 경우 역시 용량에 비례하여 억제 하였으나 최고 효능은 73.7 ± 5.0 %으로 다른 약물들에 비하여 현저히 낮았다($p < 0.05$).

4. $10 \mu M$ ryanodine은 ramp pulse로 유발되는 내향전류를 14.2 ± 2.3 % 억제하였으며, ryanodine의 이러한 봉쇄 작용은 $0Na$ 전처치로 완전히 봉쇄되었다.

5. $10 mM$ caffeine은 $0.1 mM$ $CdCl_2$ 전처치 후 잔류 내향전류를 봉쇄하였다.

이상의 결과로 보아, 흰쥐 심근에서도 근소포체로부터의 Ca^{2+} 유리가 기존의 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리기전 이외에 L-type Ca^{2+} 통로와 ryanodine 수용체 사이의 기능적 연결을 통해서도 일어나고 있음을 알 수 있다.

핵심되는 말: L-type Ca^{2+} 통로, 근소포체, ryanodine receptor, L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제, Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리

Ca²⁺ 통로 봉쇄제들에 의한 심근 근소포체

Ca²⁺ 유리 봉쇄작용의 비교

<지도 고 창 만 교수>

연세대학교 대학원 의학과

안 성 완

제1장 서론

심근에서 Ca²⁺은 전기적 신호인 활동전압을 기계적인 수축으로 전환시키는 역할을 담당한다. 즉 활동전압으로 인하여 전압 민감성 L-type Ca²⁺ 통로가 열리면 세포 외부로부터 Ca²⁺ 이온이 유입되고 유입된 Ca²⁺은 근소포체막의 Ca²⁺ 유리통로인 ryanodine 수용체(ryanodine receptor, RyR)를 개방하여 근소포체내에 저장된 Ca²⁺을 유리시키게 된다. 이러한 과정을 통해 결국 심근 세포질내 Ca²⁺ 농도는 증가하게 된다. 이와 같이 외부로부터 세포내로 유입된 Ca²⁺에 의해 근소포체로부터 Ca²⁺이 유리되어 심근 세포질내 Ca²⁺ 농도가 증가되는 현상을 Ca²⁺-유발 Ca²⁺ 유리(Ca²⁺-induce Ca²⁺ release)라 한다(Fabiato, 1983). 실제로 심근 세포에서는 종에 따라 필요한 Ca²⁺의 대부분에 해당하는 70~92 %를 근소포체로부터 공급받으며, 나머지 8~30 %를 외부에서 제공받게 된다(Bers 등 1996). 이런 과정을 통해 증가된 세포질내 Ca²⁺은 troponin C와 결합된다. 그 결과 troponin과 tropomyosine의 상호 작용이 억제되어 심근 수축이 유발된다. 이와 같이 활동전압 형성에서부터 수축이 유발되기까지의 전 과정을 흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling, E-C coupling)이라 한다(Bers, 2002).

한편, 수축기 동안에 증가한 심근 세포질내의 Ca²⁺은 이완을 유발하기 위해 세포

질에서 다시 제거되어야 한다. 이 과정에서도 평형을 유지하기 위하여 세포질내의 Ca^{2+} 은 근소포체로부터 유리된 분량만큼 근소포체로 다시 저장 되고, 외부로부터 유입된 분량만큼 다시 세포 밖으로 배출 된다(Bers 등, 1996). 먼저 Ca^{2+} 의 근소포체로의 재섭취는 근소포체 단백질의 40 %를 차지하고 있는 근소포체 Ca^{2+} 펌프(Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase Type 2, SERCA 2)에 의해 유발된다(Edes 및 Kranias, 2001). 이 과정은 보조 인단백질인 phospholamban의 인산화에 의하여 조절되며, phospholamban은 다시 (1) Ca^{2+} /calmoduline-의존 단백질 키나제 II(CaM-Kinase II)의 활성화와 (2) β -아드레날린성 자극에 의한 cAMP-의존 단백질 키나제 A(PKA)의 활성화에 의해 조절된다(Frank 등 2003). 한편, 세포 밖으로 Ca^{2+} 을 배출하는 과정에는 Na^+/Ca^{2+} 교환(Na^+/Ca^{2+} exchange, NCX)이 관여하게 된다(Bers, 1996). NCX는 세포막을 사이에 두고 세포 안팎에 존재하는 Na^+ 과 Ca^{2+} 의 농도차에 의해 발생하는 에너지를 원동력으로 Na^+ 과 Ca^{2+} 을 서로 맞교환 하는 기전이다. 그 이동 비율이 3분자 Na^+ 대하여 1분자 Ca^{2+} 이 이동하므로 Na^+ 이동 방향으로 양이온 1분자 초과에 의한 전류가 발생하게 되어, NCX는 내향 전류를 유발하며 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 유출시키게 된다. 그러므로 NCX의 내향 전류는 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 을 측정하는 지표로도 활용된다(Weber 등, 2002).

심근의 근소포체에서 Ca^{2+} 이 유리되는 통로는 균일한 4개의 단량체(homotetramer)로 구성되어 있다. 특히 이 통로는 ryanodine에 의해 선택적으로 봉쇄되므로 ryanodine 수용체(RyR)라고 불리기도 한다. 실제로 각 tetramer에는 ryanodine에 대하여 하나의 높은 친화도를 가진 결합 위치와 세 개의 낮은 친화도를 가진 결합 위치가 존재하고 있다(Bers 및 Perez-Reyes, 1999; Lai 등, 1989). RyR는 앞에서 설명한 바와 같이 심근의 활동 전압으로 개방되는 전압 민감성 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 들어온 Ca^{2+} 에 의해 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리기전을 통해 개방되어 근소포체내에 저장되어 있는 Ca^{2+} 을 세포질로 유리시킨다. 그러나 최근에는 RyR의 개방 기전에 대해 또 다른 모델이 제시되고 있다. 즉 L-type Ca^{2+} 통로와 RyR 사이에 기능적 연결이 있어 L-type Ca^{2+} 통로의 구조적 변경이 RyR의 구조적 변경을 유발할 것이라는 가능성이 그것이다(Mccall 등, 1996; Satoh 등, 1998; Katoh 등, 2000). 구

조직 변경에 의한 기능적 연결은 원래 골격근 수축에서 근소포체로부터 Ca^{2+} 이 유리되는 기전이다. 골격근에서는 L-type Ca^{2+} 통로 monomer와 RyR tetramer가 4: 1의 비율로 존재한다(Flucher 및 Franzini-Armstrong, 1998; Fill 및 Copello, 2002). 즉, 한 개의 RyR tetramer와 네 개의 L-type Ca^{2+} 통로 monomer가 연결되어 배열되어 있다. 물론, 여기에 L-type Ca^{2+} 통로 monomer와 서로 연결 되지 않은 또 한 개의 RyR tetramer 역시 나란히 배열되어 존재한다. 이러한 구조적 관계에 의해, 세포막의 탈분극에 따른 L-type Ca^{2+} 통로의 구조적 변화가 물리적으로 연결되어 있는 RyR의 구조적 변화를 초래하게 되고, 그 결과 RyR가 개방되어 근소포체내의 저장 Ca^{2+} 이 세포질로 유리됨으로써 수축이 촉발된다(Flucher 및 Franzini-Armstrong, 1996). 최근의 연구 결과들은 이와 같은 L-type Ca^{2+} 통로 monomer와 RyR tetramer 사이의 조직학적 연결이 심근에서도 비록 그 빈도는 골격근과 비교하여 현저하게 낮은 형태로나마 존재하는 것으로 보고하고 있다. 즉, 심근에서는 L-type Ca^{2+} 통로 monomer와 RyR tetramer의 비율이 역전되어 1: 5~10의 비율로 존재하는 것으로 알려져 있다(Flucher 및 Franzini-Armstrong, 1998; Fill 및 Copello, 2002). 이러한 비율의 역전으로 인해 심근 세포에서는 RyR의 개방이 구조적 변경에 의한 기능적 연결 보다는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 이용하는 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리기전을 주 기전으로 사용하게 되는 것이다(Wier 및 Balke, 1999; Scriven 등, 2000; Bers, 2001). 그렇다 하더라도, 심근에서도 L-type Ca^{2+} 통로와 RyR의 구조적 연결은 분명히 존재하고 있으므로, 심근에서도 구조적 변경에 의한 기능적 연결 기전이 존재할 가능성은 충분히 존재한다 하겠다. 뿐만아니라 실제 그 가능성을 암시하는 결과들도 일부이나마 보고되기도 하였다(Mccall 등, 1996; Satoh 등, 1998; Katoh 등, 2000). 그러나, 심근의 경우에는 그 연결 비율에서도 짐작할 수 있듯이 기능적 연결이 있다 하여도 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리기전에 비하여 월등히 적기 때문에 그 존재를 확실히 입증한 연구 결과는 아직 없는 실정이다.

이러한 와중에서 골격근에서의 최근의 연구 결과를 종합하여 보면, L-type Ca^{2+} 통로와 RyR의 상호 작용에 있어서 L-type Ca^{2+} 통로의 domain II와 domain III 사이의 세포질내 loop가 결정적인 역할을 한다고 알려지고 있다(Lu 등, 1994;

El-Hayek 등, 1995; Nakai 등, 1998; Li 등, 1999; Henrikson 등, 1999; Dulhunty 등, 1999; Gurrola 등, 1999; Zhu 등, 1999; Lamb 등, 2000). 이러한 사실은 여러 가지 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 경우 Ca^{2+} 통로에 대한 결합 부위에 따라 근소포체로부터의 Ca^{2+} 유리 봉쇄 정도 역시 달라질 수 있다는 새로운 가능성을 암시한다 하겠다. 실제로, 대표적인 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제인 dihydropyridine계, phenylalkylamine계 및 benzothiazepine계의 약물들은 L-type Ca^{2+} 통로에 대한 결합 위치가 서로 다르며, 이들 각 부위 사이에는 알로스테릭 연결(allosteric link)이 되어 있다(Hockerman 등, 1997). 그러므로 본 연구에서는 서로 다른 부위에 결합하여 Ca^{2+} 통로를 봉쇄하는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들을 이용하여 심근에서 근소포체로부터의 Ca^{2+} 유리에 미치는 영향을 비교 분석함으로써 심근 근소포체의 Ca^{2+} 유리에 있어서 RyR와 L-type Ca^{2+} 통로와의 구조적 변경에 의한 기능적 연결의 존재 여부를 규명하여 보고자 하였다.

한편, 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 의 양적 측정에는 여러 가지 실험방법이 이용되고 있다. 그 중에서도 (1) Ca^{2+} -indicator인 fura-2 등의 형광물질을 사용하여 Laser Scanning Confocal Microscopy(LSCM)으로 검출하는 방법과 앞에서 언급한 (2) NCX의 전류를 이용하는 방법이 있다. LSCM를 이용하는 방법은 근소포체 Ca^{2+} 유리에 대한 선택도는 높으나 해상도는 경우에 따라서는 충분하지 않을 수 있다. 즉, 어느 곳에서 Ca^{2+} 이 유리되는 지를 시각화 할 수 있는 반면에 Ca^{2+} 의 검출 한계가 있어 극미량의 Ca^{2+} 변화를 검출할 수는 없다. 반면 NCX의 전류를 검출하는 방법은 어느 부위에서 유리된 Ca^{2+} 인지를 알 수는 없지만 극미량의 Ca^{2+} 을 검출할 수 있는 극히 높은 민감도를 가지고 있다. 만약 NCX가 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 대해서만 선택적으로 작용할 수 있는 환경이 주어진다면, NCX는 근소포체 Ca^{2+} 유리 측정에 있어 가장 우수한 도구가 될 수 있을 것이다. 이러한 환경은 빠른 Ca^{2+} 완충제인 BAPTA를 세포내 투석함으로써 어느 정도 실현할 수 있게 된다. 즉 Ca^{2+} 의 확산 시간을 극도로 제한하여 Ca^{2+} 의 반응을 극히 미세한 영역내로 제한함으로써 가능하게 할 수 있게 된다는 것이다. 이러한 상황 하에서는 전기 자극을 통해 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킨다 하여도 유리된 Ca^{2+} 이 세포질내로 확산되어져 나가기 이전에 BAPTA에 의해 포획되어 세포질내 Ca^{2+} 농도 증가는 나타나지 않게 될 것이

다. 그러나 만약 이러한 상황 하에서 전기 자극을 통해 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킬 때에 발생하는 NCX의 내향전류(inward I_{NCX})가 측정된다면, 이때의 내향성 I_{NCX} 는 근소포체에서 유리되는 Ca^{2+} 이외에는 다른 Ca^{2+} 공급원이 없으므로 바로 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 의 지표로 활용될 것이다(Weber 등, 2002).

그러므로, 본 연구에서는 세포질내 Ca^{2+} 의 확산시간을 극도로 제한함으로써 Ca^{2+} 의 반응을 미세한 영역으로 제한하여 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 교환 전류를 측정하였고, 이때 서로 다른 부위에 결합하여 Ca^{2+} 통로를 봉쇄하는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들이 심근 근소포체로부터의 Ca^{2+} 유리에 미치는 영향을 비교 분석함으로써 심근에서 L-type Ca^{2+} 통로와 근소포체의 Ca^{2+} 유리통로 활성 사이의 기능적 연결의 존재 여부를 규명하여 보고자 하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 단일 심근 세포의 분리

본 실험에서는 체중 250 g~300 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 사용하여 Mitra와 Morad(1985)의 효소 분리 방법에 따라 심실근세포를 분리하였다. 즉, 흰쥐에게 heparin 500 IU/kg을 복강 내 주사로 전처치한 후 pentobarbital sodium 50 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취를 유도하였다. 흉곽을 열고 대동맥 기시부를 보존한 상태로 심장을 재빨리 적출한 후 heparine이 포함된 37°C의 Ca^{2+} 이 제거된 Tyrode 용액에 담근 다음 부드럽게 두 세 차례 짜주어 심실내의 혈액을 제거하였다. 이어서 빠른 시간 내에 대동맥에 관을 삽입한 후, peristaltic pump를 이용하여 분당 6 ml 로 100 % 산소가 포화된 Ca^{2+} 제거 Tyrode 용액이 관상 혈관을 통하여 심근 조직으로 흐르도록 관류시켰다. 8분 후 1 mg/ml의 collagenase(type A, Boehringer)와 0.1 mg/ml의 protease(type XIV, Sigma)를 첨가한 Ca^{2+} 제거 Tyrode 용액으로 15분간 관류시킴으로써 심근내 결체조직을 분해시켰다. 다시 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액으로 바꾸어 6 분간 관류하여 조직내 효소를 씻어내었다. 이 후 심실 조직만 떼어내어 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액이 들어있는 petri dish로 옮겨 해부 가위로 조직을 여러 번 길이 방향으로 흠집을 낸 후 부드럽게 흔들어 단일 심실근세포로 분리하였다. 분리된 심실근세포는 실온에서 보관하였으며, 분리 후 10시간 이내에 사용하였다. 본 실험에 사용한 Tyrode 용액의 조성은 136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 0.99 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose이고 충분히 교반한 후 1 N NaOH로 pH를 7.4로 적정하여 사용하였다.

2.2. 단일 심근 세포에서 막전류 측정

도립현미경 위에 설치된 patch chamber로 분리한 심실근세포를 분주하였다. 이

후 약 10분 정도 세포를 안정시킨 다음에 2 mM Ca^{2+} 이 포함된 Tyrode 용액으로 분당 3 ml의 속도로 실험 전 과정 동안 관류시켰다. 막전류 측정에 사용하는 미세유리 전극은 microelectrode puller(P-97, Sutter Inc, Novato, CA, USA)를 사용하여 직경 1.5 mm 유리관(BF150-117-15, Sutter Inc, Novato, CA, USA)의 첨끝을 직경이 1.5 μm 정도가 되게 제작하였다. 이때 미세전극의 거칠은 첨끝은 microfuge(MF-83, Narishige, Japan)을 사용하여 매끈하게 열처리하였다. 미세전극의 전극저항은 1~3 M Ω 정도 되는 것을 사용하였고 3 M Ω 이상 되는 전극은 전극용액의 확산에 영향을 미칠 수 있으므로 사용하지 않았다. 미세전극에 전극용액을 채우고 patch clamp amplifier(Axopatch 200B, Axon instrument, Foster city, USA)의 headstage에 연결하였다. 전기적 자극을 주기 위해 patch clamp amplifier와 연결된 컴퓨터에서 Pclamp 9 software(Axopatch 200B, Axon instrument, Foster city, USA)을 이용하여 막전압을 0 mV로 유지하고 10 mV 크기의 과분극의 전기적 자극을 주면서 수력식 현미조작기(Hydraulic micromanipulator MHW-3, Narishige, Japan)를 사용하여 미세유리전극을 심실근세포에 접촉시켰다. 접촉시킨 후 전극내부에 가벼운 음압을 가하여 giga seal를 형성하였다. Giga seal를 형성하여 약 1분간 안정시킨 후 막전압을 -40 mV로 유지하고 10 mV 크기의 과분극의 전기적 자극을 주면서 가벼운 음압을 가하여 미세유리전극과 접촉된 근세포막을 파열시켜 whole-cell mode patch를 형성하였다. 측정된 전류를 세포크기에 따라 보정하기 위해 근세포의 축전전류(capacitance current)를 10 mV 크기로 과분극을 시킨 상태에서 Pclamp 9 software로 측정하였다. 전극용액이 세포질로 확산되도록 10분간 기다린 후 각각의 실험에 따른 막전압을 고정하고 약물에 대한 실험을 실시하였다. 막전류의 변동을 측정하기 위해 사용한 전극 용액은 세포내 Ca^{2+} 의 확산을 제한하기 위하여 고농도의 Ca^{2+} 완충용액을 사용하였고, K^+ 전류의 간섭을 배제하기 위해 K^+ 를 Cs^+ 으로 대체하고 TEA를 첨가한 전극용액(10 mM NaCl, 105 mM CsCl, 1 mM CaCl_2 , 10 mM BAPTA(1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 5 mM ATP-Mg, 20 mM TEA-Cl, 0.1 mM cAMP, pH 7.2 with CsOH)을 사용하였다.

2.3. 단일 심근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

분리한 심실근세포의 Ca^{2+} 변화는 Ca^{2+} -indicator인 fura-2/AM(Molecular Probe, Eugene, OR, USA)를 이용하여 세포질내의 Ca^{2+} 변동을 검출하였다. 먼저 분리한 심실근세포를 2 ml 용량의 배양접시(culture dish)에 분주한 후 30분간 세포가 안정되기를 기다렸다. 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액에 fura-2/AM을 첨가하여 최종농도를 4 μ M로 만든 다음, 배양접시의 용액과 바꾸어 빛을 차단한 상태로 2시간 동안 실온에 방치하였다. 2시간 후 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액으로 두 번 정도 씻어주어 fura-2/AM의 흡수를 종결하였다. 다시 심실근세포를 patch chamber로 분주하여 10분 정도 안정화 시킨 후 2 mM Ca^{2+} 이 포함된 정상 Tyrode 용액으로 관류시켰다. 그리고 BAPTA 농도가 각각 0 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM로 맞추어진 서로 다른 전극용액을 사용하여 whole-cell mode patch를 시행하였다. whole-cell mode를 형성한 후 세포질내로 전극용액이 확산되도록 10분 정도 기다린 다음 막전압을 -40 mV로 고정된 상태에서 +100 mV에서 -100 mV까지 200 ms동안 ramp pulse로 탈분극의 전기적 자극을 주었다. 이 때 일어나는 세포질내의 Ca^{2+} 변동은 형광측정장치(photon technology International Inc, Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하여 340 nm와 380 nm의 두 개의 흥분파장을 번갈아 가며 Ca^{2+} 과 결합한 fura-2를 여기 시키고 이때 방사하는 에너지를 510 nm의 방사파장에서 Felix software(photon technology International Inc, Lawrenceville, NJ, USA)로 검출하여 340 nm/380 nm 비율의 형광세기를 측정하였다.

2.4. 시약

L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제인 verapamil, diltiazem, nifedifine은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 결합조직 분해효소인 collagenase A는 Boehringer Mannheim사의 제품을 사용하였고, protease type XIV는 Sigma사 제품을 사용하였다. 그리고 마취를 유도하기 위해 사용한 heparine(국산)과 pentobarbital sodium(국산)은 국내제조

업체의 제품이었다. Tyrode 용액의 제조에 사용한 제품은 모두 Sigma사의 제품 이었다. Verpamil과 diltiazem은 고농도로 3차 증류수에 녹여 -70 °C에 보관하였다가 이 후 사용시 희석하여 사용하였고, nifedifine는 DMSO에 고농도로 녹여 -70 °C에 보관하였다가 희석하여 사용하였다, 특히 nifedifine의 경우 DMSO(dimethyl sulfroxide)의 효과를 최소화하기 위하여 DMSO의 최종농도가 0.1 %를 넘지 않게 사용하였다. 나머지 시약은 사용하기 직전에 녹여 사용하였다. 모든 약물은 내향 정류성 K⁺ 전류(inward rectifier K⁺ current)를 억제하기 위하여 Tyrode 용액에서 5.4 mM KCl를 제거하였고 Cl⁻ 전류를 억제하기 위하여 0.1 mM DIDS (4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid)를 첨가한 Tyrode 용액을 사용하여 용해하였다.

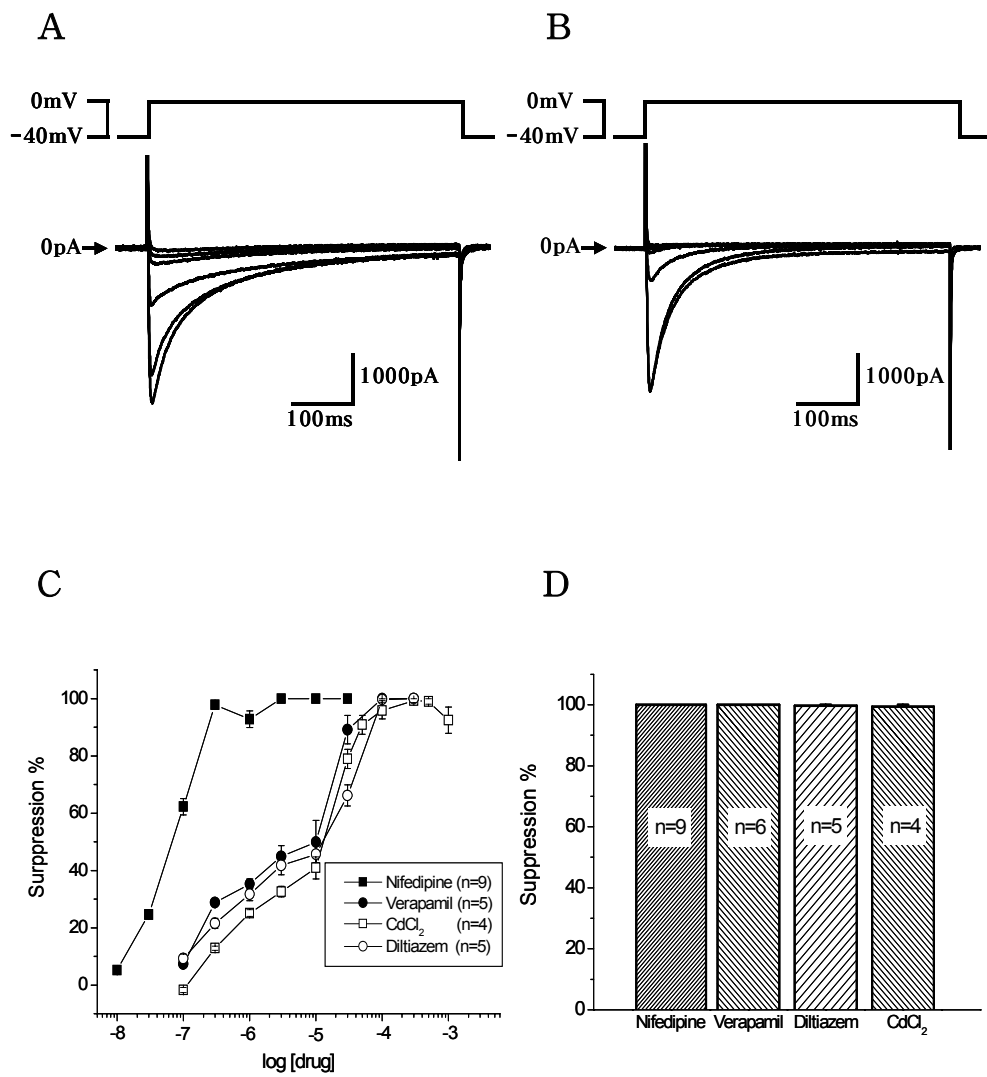
2.5. 자료 분석

자료의 획득 및 처리는 Pclamp 9(Axon instrument, Foster city, USA)와 Origin version 6(Microcal, Northampton, USA)를 이용하였고 모든 결과는 평균± 표준오차로 나타내었다. 자료의 분석은 paired t-검정과 unpaired t-검정으로 확인하였고 이 때 p 값은 0.05 이하 일 때 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

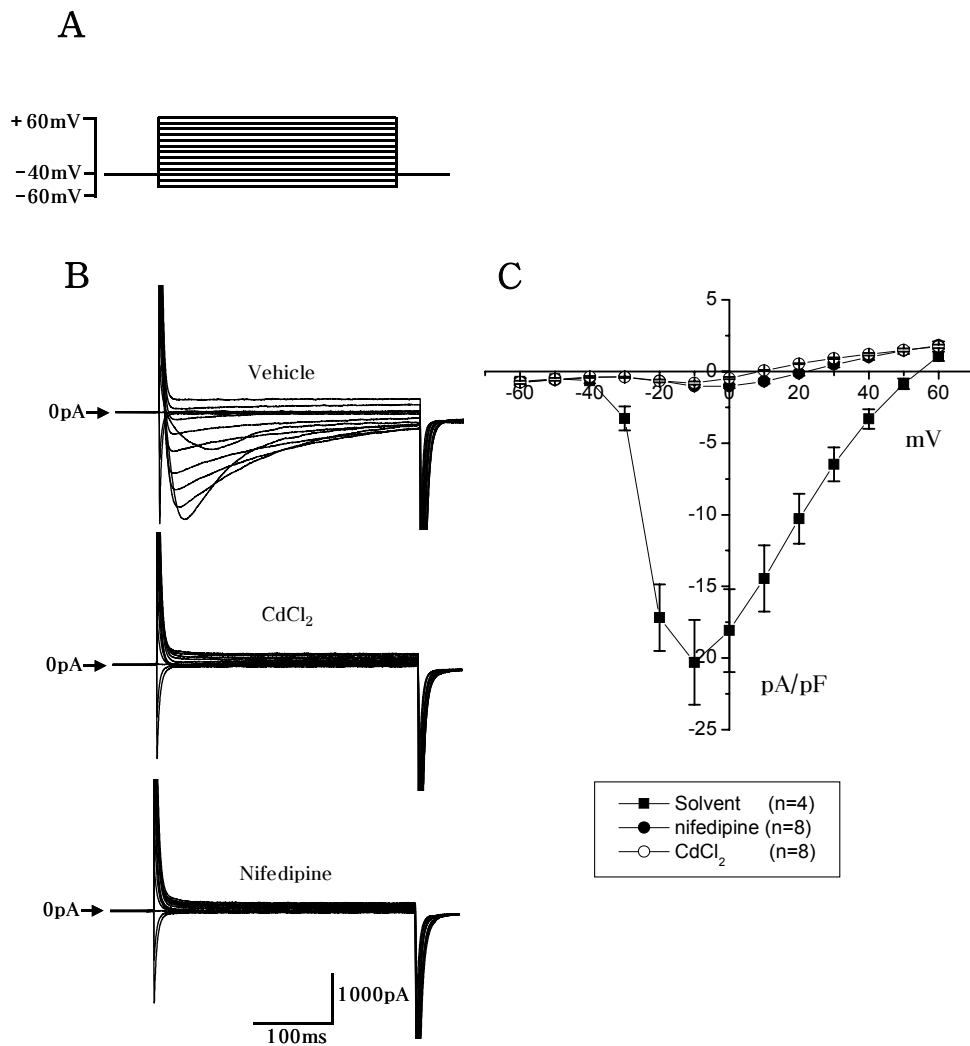
제3장 결과

3.1. Ca^{2+} 전류 봉쇄작용의 비교

분리한 흰쥐 단일 심실근세포는 10 mM BAPTA로 세포내 투석 후, 막전압을 -40 mV로 고정시킨 상태에서 0 mV까지 500 ms동안 사다리형 전기 자극으로 탈분극 시킴에 따라 Ca^{2+} 전류(I_{CaL})를 발생하였다. 발생된 I_{CaL} 의 최대치는 -17.7 ± 0.5 pA/pF($n=50$)이었고, 본 실험에 사용한 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들인 nifedipine, diltiazem, verapamil 및 CdCl_2 에 의해 용량 의존적으로 봉쇄되었다(제1도 A 및 B). 즉, nifedipine의 경우 10 nM에서부터 봉쇄가 나타나기 시작하여 1 μM 에서는 완전히 봉쇄되었다. 또한 verapamil, diltiazem 및 CdCl_2 의 경우는 각각 100 nM 근처에서 봉쇄가 나타나기 시작하여 100 μM 의 농도에서는 완전히 봉쇄하였다(제1도 C). 비록 I_{CaL} 의 봉쇄 효과에 있어서 봉쇄제들 간에 농도 차이는 있지만, 각 봉쇄제의 최대 봉쇄효과에는 차이가 없었다(제1도 D). 제2도에서는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 Ca^{2+} 전류 봉쇄 작용에 있어 전압에 따른 차이를 비교하기 위하여 제2도 A와 같이 -60 mV ~ +60 mV까지 10초 간격으로 10 mV씩 300 ms에 걸쳐 올려 전기 자극함으로써 얻은 전류-전압(I-V) 관계에 대한 nifedipine 및 CdCl_2 의 봉쇄 작용을 관찰하였다. 1 μM nifedipine 과 0.1 mM CdCl_2 에 의해 각 전압에서 유발된 내향전류가 완전히 차단되는 것을 볼 수 있다(제2도 B 와 C). 이와 같은 결과는 비록 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제들이 화학구조도 다르고, L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄에 있어서 결합위치가 각각 다르다 하더라도, L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 전류에 대한 봉쇄는 서로 간에 차이가 없이 완벽하다는 것을 의미한다.



제 1 도. Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 용량 의존적 Ca²⁺ 전류 봉쇄작용의 비교. Ca²⁺ 전류는 막 전압을 -40 mV로 고정된 상태에서 0 mV로 500 ms 동안 10초 간격으로 사다리형 전기 자극으로 유발하였다. A: CdCl₂의 용량에 따른 Ca²⁺ 전류의 봉쇄. B: Nifedipine의 용량에 따른 Ca²⁺ 전류의 봉쇄. C: Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 용량반응 곡선. D: Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 최대 봉쇄 효과(1 μM nifedipine, 100 μM verapamil, 100 μM diltiazem, 100 μM CdCl₂). n은 실험 예수.



제 2 도. Ca^{2+} 전류의 전류-전압 관계에 대한 nifedipine($1 \mu\text{M}$) 및 CdCl_2 (0.1 mM)의 봉쇄작용의 비교. A: 전기 자극 방법: 막전압을 -40 mV 로 고정된 상태에서 -60 mV 로부터 $+60 \text{ mV}$ 까지 10 mV 씩 300 ms 동안 10 초 간격으로 전기자극을 시행. B: 약물에 따른 실제 Ca^{2+} 전류의 변동. C: Nifedipine 및 CdCl_2 의 Ca^{2+} 전류의 전류-전압 관계 봉쇄작용. Vehicle: KCl 제거 Tyrode 용액 + 0.1 mM DIDS. n은 실험 예수.

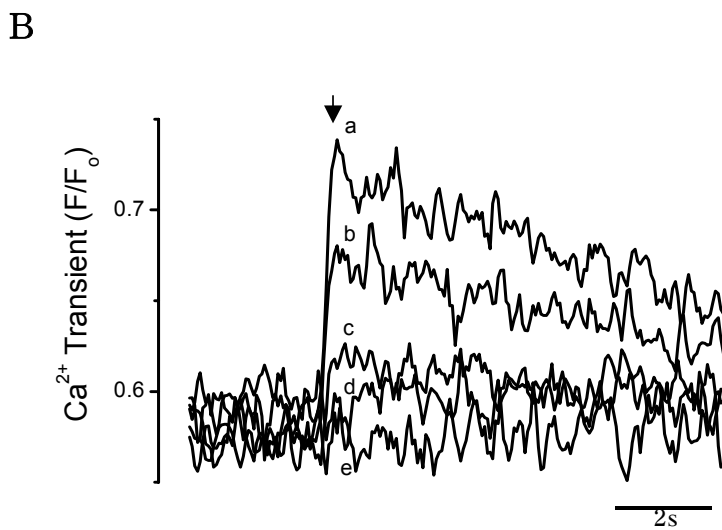
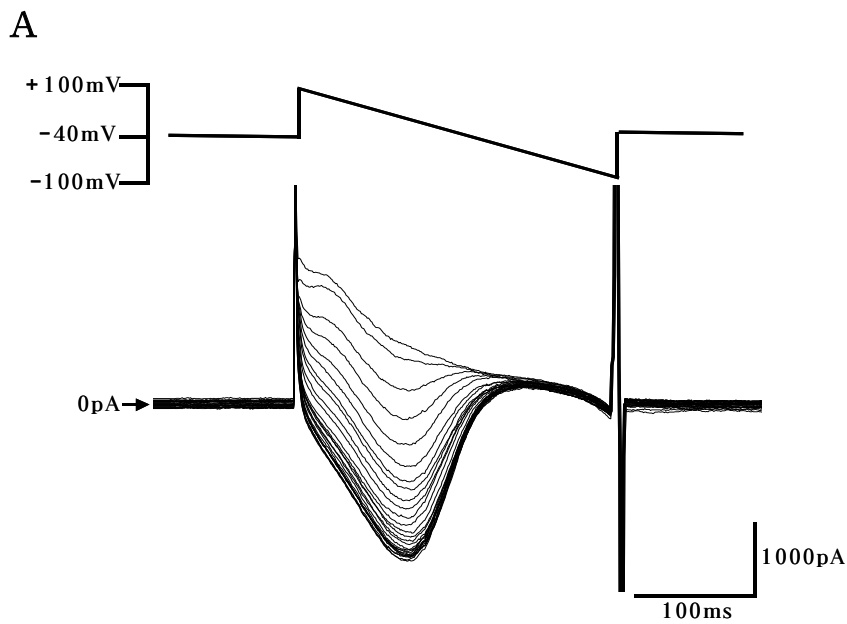
3.2. Ramp pulse 유발 내향전류에 대한 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들의 봉쇄작용 비교

막전압을 -40 mV로 고정시킨 상태에서 심근의 활동전압(action potential)과 유사한 자극을 주기 위하여 $+100$ mV에서 -100 mV까지 200 ms동안 10초 간격으로 ramp pulse를 주어 막전압을 탈분극 시켰다. 흰쥐 심실근세포는 patch 후 바로 외향전류가 발생하였고 이 후에 점점 작아지다 내향전류로 역전되었다. 이렇게 발생한 내향전류는 평형상태에 도달하는데 8~12분 정도 걸렸고, 이때의 최대 내향전류는 -12.2 ± 0.6 pA/pF이었다(제3도 A). 이러한 심실근세포의 patch 후 외향전류에서 내향전류로의 변화는 전극용액내의 KCl과 대치하여 첨가한 CsCl와 TEA에 의한 K^+ 전류의 억제에 의한 결과라 판단된다. 또한 내향전류는 10 mM BAPTA의 Ca^{2+} 완충작용의 결과 Ca^{2+} 에 의한 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄작용의 억제와 아울러 첨가된 cAMP에 의한 L-type Ca^{2+} 통로의 활성화에 의한 것이라고 판단된다(Hadely 및 Hume, 1987; Kass 및 Sanguinetti, 1984; Lee 등, 1985; Bers 및 Perez-Reyes, 1999).

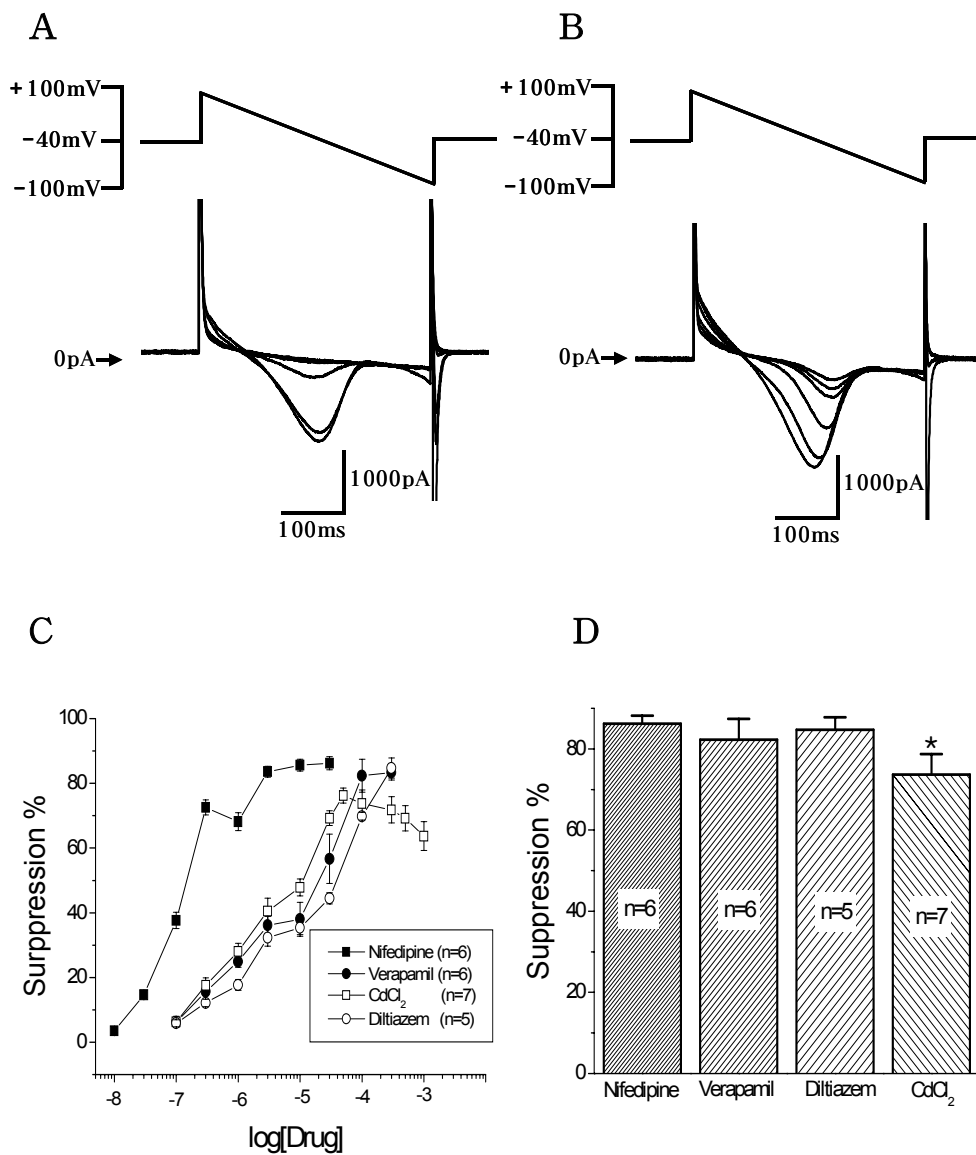
또한 빠른 Ca^{2+} 완충제인 BAPTA는 농도에 비례하여 전기 자극시 발생하는 세포질내의 Ca^{2+} 농도 변동을 억제시켰다. 즉, BAPTA 3 mM까지는 세포질내의 Ca^{2+} 변동을 검출할 수 있었지만, 5 mM 이상에서는 세포질내의 Ca^{2+} 변동이 검출되지 않았다(제3도 B). 이러한 결과는 결국 고농도의 BAPTA는 내향전류를 증가시키며 L-type Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 세포질내로 확산되는 것을 완전히 제한시킨다는 사실을 의미한다. 그리하여 본 실험에서는 ramp pulse의 탈분극 자극에 의해 유발된 Ca^{2+} 이 세포질내로의 확산되는 것을 완전히 제한시키기 위하여 10 mM BAPTA를 사용하였다. 그러므로 이러한 상황 하에서는 모든 Ca^{2+} 과 연관된 반응은 세포질내 전체의 Ca^{2+} 농도 변동과는 무관한 극히 제한된 국소 부위에서 발생하는 반응이 될 것이다.

이러한 상황 하에서 ramp pulse의 탈분극으로 발생한 내향전류에 대한 L-type

Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 봉쇄 작용을 비교하여 보았다. 그 결과 각각의 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들에 의해 용량 의존적으로 봉쇄되었다(제4도 A 및 B). 즉 nifedipine는 10 nM에서부터 봉쇄되기 시작하여 10 μ M에서 최대로 봉쇄되었으며, verapamil, diltiazem 및 CdCl₂의 경우에는 각각 100 nM에서 봉쇄되기 시작하여 300 μ M, 300 μ M, 100 μ M에서 최대로 봉쇄되었다(제4도 C). 그러나 최대 봉쇄작용에 있어서 nifedipine은 86.2 \pm 2.0 %의 봉쇄효과를 나타낸 반면 CdCl₂은 73.7 \pm 5.0 %의 봉쇄효과를 나타내어 nifedipine에 비하여 현저하게 그 봉쇄작용이 낮았다(P<0.05). 한편 verapamil과 diltiazem은 각각 82.3 \pm 5.1 %와 84.7 \pm 3.1 %의 최대 봉쇄작용을 나타내었으며, nifedipine의 봉쇄작용과 거의 유사하였다(제4도 D). 이러한 결과를 제1도와 제2도에서 각 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 I_{CaL} 봉쇄강도에 차이가 없다는 결과와 종합하여 보면 ramp pulse로 유발한 내향전류에 대한 CdCl₂의 봉쇄작용이 nifedipine 등 다른 유기 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들과 비교하여 미약한 것은 I_{CaL}과는 무관한 또 다른 내향전류를 봉쇄하지 못하여 초래되는 결과라는 것을 의미하게 된다.



제 3 도. BAPTA 세포내 투석이 심실근세포의 막전류 및 세포질내 Ca^{2+} 농도 변동에 미치는 영향. 막전압을 -40 mV 로 고정된 상태에서 $+100 \text{ mV}$ 로부터 -100 mV 까지 200 ms 동안 ramp pulse를 10 초 간격으로 전기 자극하였음. A: 막전류의 변동. B: BAPTA 농도의존적 세포질내 Ca^{2+} 농도 변화(a: 0 mM BAPTA, b: 1 mM BAPTA, c: 3 mM BAPTA, d: 5 mM BAPTA, e: 10 mM BAPTA). 화살표: 전기 자극 시점.



제 4 도. Ramp pulse에 의해 유발된 내향전류에 대한 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 용량 의존적 봉쇄작용의 비교. A: Nifedipine 용량 의존적 내향전류 봉쇄. B: CdCl₂ 용량 의존적 내향전류 봉쇄. C: Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 용량 반응 곡선. D: 각 Ca²⁺ 통로 봉쇄제들의 최대 내향전류 봉쇄작용의 비교(10 μM nifedipine, 300 μM verapamil, 300 μM diltiazem, 100 μM CdCl₂). *: p < 0.05 ; unpaired students t-test. n은 실험 예수.

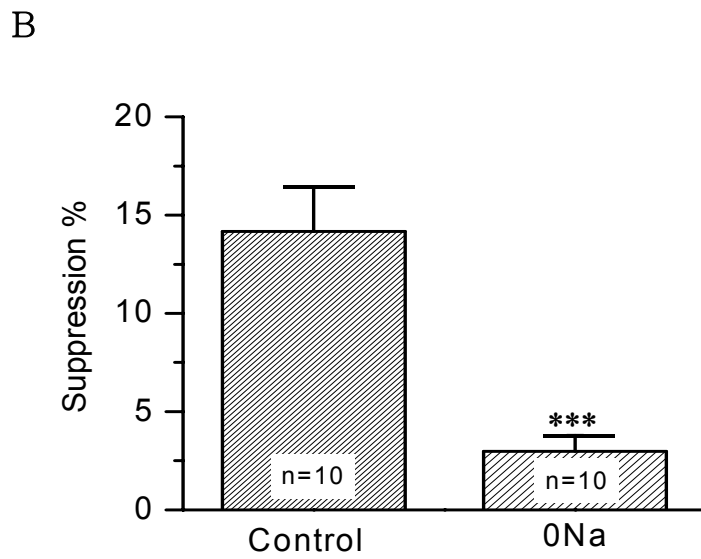
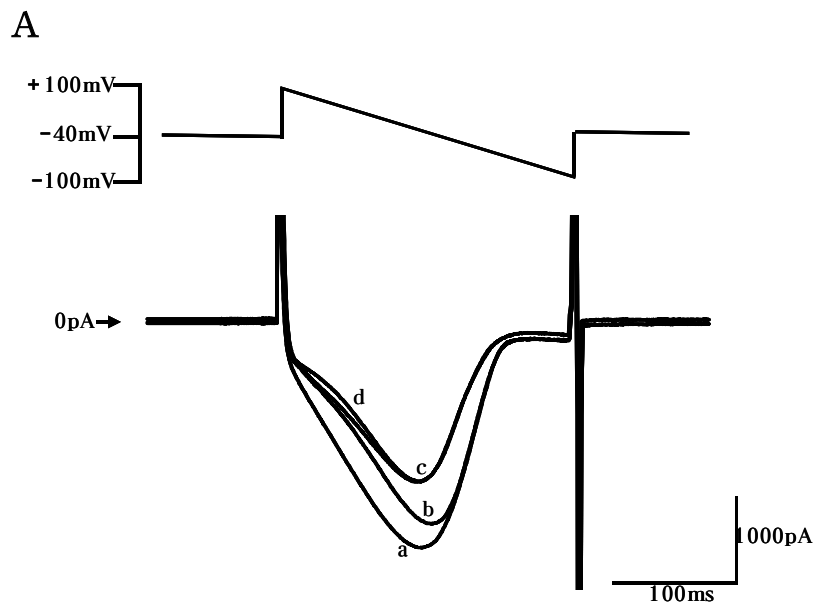
3.3. 봉쇄제들의 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄작용

이번 실험에서는 Ca^{2+} 을 제외한 Na^+ , K^+ 및 Cl^- 에 의한 전류들의 간섭을 최대한 배제하고자 하였다. 즉, Na^+ 전류는 막전압을 -40 mV로 고정함으로써 봉쇄하였고, K^+ 전류는 전극용액 내에 CsCl과 TEA를 처치하고, 외부 영양액내의 K^+ 을 제거함으로써 배제하였다. 여기에 Cl^- 전류를 봉쇄하기 위하여 DIDS를 외부 영양액에 첨가하였다. 그러므로 현 실험 조건에서 활성화 되는 전류는 필연적으로 어떠한 형태로든지 Ca^{2+} 과 관련이 있을 수밖에 없을 것이다. 이러한 상황 하에서 ramp pulse에 의해 I_{CaL} 과 무관한 내향전류를 유발할 수 있는 가능성은 NCX의 활성화에 의한 I_{NCX} 가 유일하다 하겠다. 즉, NCX는 세포막을 사이에 두고 세포 안팎에 존재하는 Na^+ 과 Ca^{2+} 의 농도 차에 의해 발생하는 에너지를 원동력으로 하여 Na^+ 과 Ca^{2+} 을 서로 맞교환 하는 기전이며, 그 이동 비율이 3분자 Na^+ 대하여 1분자 Ca^{2+} 이 이동하므로 Na^+ 이동 방향으로 양이온 1분자 초과에 의한 전류가 발생하게 된다. 그러므로 NCX는 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 유출시키면서 내향전류를 유발하게 된다. 한편, BAPTA로 세포내 투석시킨 심근세포에서 내향성 NCX 전류를 유발하게 되는 Ca^{2+} 의 기원은 I_{CaL} 을 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체에서 유리된 Ca^{2+} 이 될 것이다. 그러나 본 실험에서는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제로 I_{CaL} 을 봉쇄하였다. 그러므로 NCX를 통해 내향전류를 발생할 수 있는 Ca^{2+} 의 기원은 근소포체가 된다.

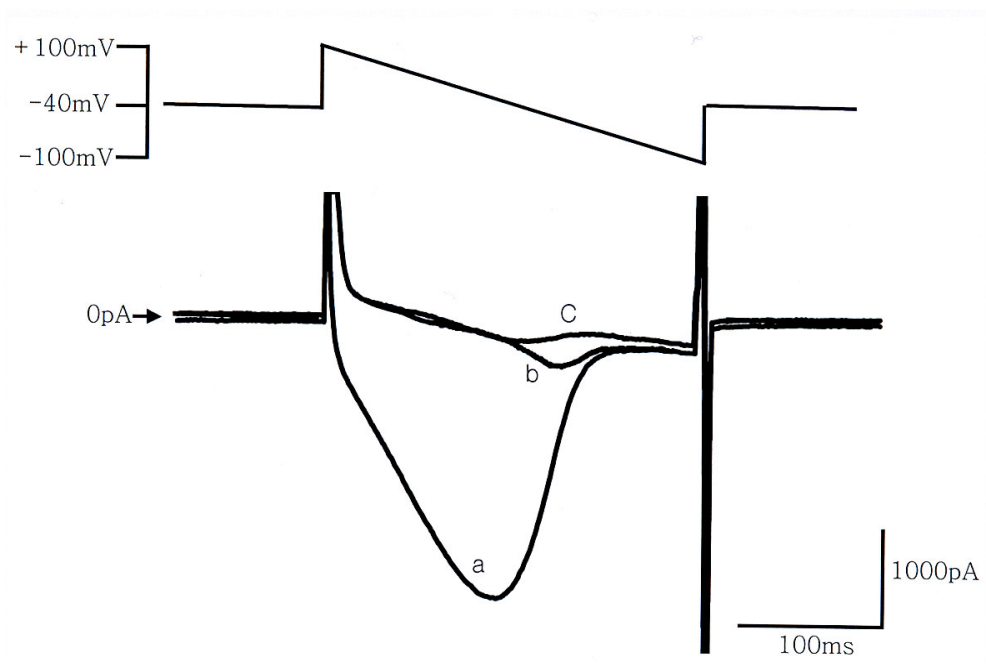
그리하여 ramp pulse로 유발한 내향전류에서 0.1 mM CdCl_2 에 의해 봉쇄되지 않은 부분이 근소포체 저장 Ca^{2+} 유리에 의한 것인지를 확인하기 위하여 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로 억제제인 ryanodine을 투여하여 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로를 봉쇄하였다. 그 결과 탈분극에 의해 발생한 내향전류는 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로 봉쇄제인 10 μM ryanodine에 의해 14.2 ± 2.3 %가 봉쇄 되었다(제5도 A). 이것으로 보아 전체 내향전류중 적어도 14 %는 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 유발되는 것을 알 수 있다. 실제로 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 은 NCX를 통해 세포 밖으로 유출되며 이 때 내향전류를 생성하게 된다. 그러므로 ryanodine으로 봉쇄된 14 %의 내향

전류도 NCX 전류일 가능성이 크다. 그러므로 NCX를 봉쇄하기 위하여 약물용매에서 136 mM NaCl를 같은 농도의 LiCl로 대체하여 Na^+ 배제용액(0Na)으로 만들어 관류시켜 ryanodine작용의 봉쇄여부를 검색하여 보았다. 먼저 0Na 단독관류는 ramp pulse 유발 내향전류를 22.7 ± 2.8 %를 억제하였다. 반면에 0Na에 10 μM ryanodine을 첨가하여 관류한 경우에는 0Na 단독관류와 비교하여 별다른 억제를 나타내지 못하였다(제5도 B). 결국 이러한 결과는 ryanodine으로 봉쇄되는 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 내향전류가 NCX를 매개하여 발생된다는 사실을 의미하고 있다 하겠다. 더욱이 이러한 결과들로 보아 10 mM BAPTA의 세포내 투석으로 Ca^{2+} 이동을 극도로 제한함으로써 세포질내 Ca^{2+} 농도 변동이 완전히 소실된 상황 하에서도 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리기전에 의하여 근소포체의 RyR를 통해 Ca^{2+} 유리가 일어나고 있으며, 이 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 내향 I_{NCX} 를 형성하며 세포 밖으로 유출되고 있다는 사실을 알 수 있다.

한편, 10 mM BAPTA 투석 후 흰쥐 심실근세포에서 발생하는 내향전류 중에서 다른 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제에 의해 억제되나 0.1 mM CdCl_2 에 의해서는 억제 되지 않는 부분이 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의한 것인지를 확인하기 위하여 근소포체내의 저장 Ca^{2+} 을 10 mM caffeine를 사용하여 고갈시켜 보았다. 그 결과 제6도에서 보는 바와 같이 0.1 mM CdCl_2 에 10mM caffeine을 첨가하여 관류함으로써 인해 0.1 mM CdCl_2 투여 후 잔류하는 내향전류가 억제되었고 그 강도는 다른 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제에 의한 억제와 유사하였다. 이러한 결과로 보아 0.1 mM CdCl_2 로 봉쇄되지 않은 내향전류는 근소포체의 Ca^{2+} 유리에 기인한다는 사실을 알 수 있다. 즉, 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 세포 밖으로 배출되면서 내향전류가 발생되었다는 것을 의미한다. 그러나 본 실험결과는 이와 같은 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 내향성 NCX 전류가 0.1 mM CdCl_2 에는 봉쇄되지 않으나, nifedipine과 다른 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들로는 봉쇄되고 있음을 보여주고 있다. 그러므로 이러한 결과는 근소포체로부터의 Ca^{2+} 유리가 CdCl_2 에 의해서는 봉쇄되지 않으나, nifedipine등 다른 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들에 의해서는 봉쇄되었음을 직접적으로 의미한다.



제 5 도. Ryanodine($10 \mu\text{M}$)의 내향전류 봉쇄작용. A: 실제 내향전류의 변동. B: Ryanodine의 내향전류에 대한 Na^+ depletion의 억제. a: Vehicle 단독, b: $10 \mu\text{M}$ ryanodine, c: 0Na 단독, d: 0Na + $10 \mu\text{M}$ ryanodine. n은 실험 예수. ***: $p < 0.001$ unpaired student t-test.



제 6 도. 0.1 mM CdCl₂에 의해 억제되지 않은 내향전류에 대한 10 mM caffeine의 분쇄작용. a: Vehicle 단독, b: 0.1 mM CdCl₂, c: 0.1 mM CdCl₂ + 10 mM caffeine.

제4장 고찰

이번 연구의 핵심적 결과는 다음과 같이 요약된다. Ca^{2+} 통로에 대한 결합 부위가 서로 다른 Ca^{2+} 통로 봉쇄제인 nifedipine, verapamil, diltiazem 및 CdCl_2 의 경우 사다리형의 전기 자극으로 유발된 Ca^{2+} 전류에 대한 봉쇄 정도는 서로 차이가 없었으나, ramp pulse로 유발되는 내향전류에 대한 봉쇄작용은 CdCl_2 의 경우가 nifedipine, verapamil 및 diltiazem에 비해 명백하게 약하였다. 이러한 결과는 심근에는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제에 의해 봉쇄되는 Ca^{2+} 전류와는 무관한 또 다른 내향전류가 존재하며, 그 봉쇄 정도는 Ca^{2+} 통로에 대한 약물의 결합 부위에 따라 달라진다는 것을 직접적으로 의미하게 된다.

본 연구의 추가적인 실험 결과들은 위에서 언급한 Ca^{2+} 전류와는 무관한 또 다른 내향전류가 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 세포 밖으로 배출되면서 발생하는 내향성 I_{NCX} 라는 사실을 제시하고 있다. 즉, 제5도에서 보여주는 바와 같이 ramp pulse로 인해 발생하는 내향전류 중 14 %가 RyR를 봉쇄하는 ryanodine에 의해 봉쇄되며, 이러한 ryanodine의 내향전류 봉쇄작용은 0Na 전처치로 인해 완전히 소실되었다. 더욱이 본 실험에서는 빠른 Ca^{2+} 완충체인 BAPTA를 세포내 투석으로 Ca^{2+} 의 확산속도를 극도로 제한하였으므로, 이러한 상황 하에서 발생하는 모든 Ca^{2+} 관련 반응은 지극히 좁은 반경 내의 국소부위에서 발현되는 현상인 것이다. 이러한 전제는 제3도에서 전기 자극시 발생하는 세포내 Ca^{2+} 농도 증가가 10 mM BAPTA에 의해 완전히 소실되어지는 결과에서도 확인할 수 있다. 그러므로 이번 연구의 결과는 적어도 ramp pulse로 인해 발생하는 내향전류 중 14 %는 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 세포 밖으로 배출되면서 발생하는 내향성 I_{NCX} 라는 사실을 명확히 제시하고 있다 하겠다. 이와 같은 사실은 동시에, 1 μM nifedipine으로는 봉쇄되나 0.1 mM CdCl_2 로는 봉쇄되지 않는 내향전류가 10 mM caffeine 전처치에 따른 근소포체내 Ca^{2+} 고갈로 인해 봉쇄되는 결과로부터, Ca^{2+} 통로 봉쇄제들 사이에는 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄작용 강도에 있어 차이가 존재한다는 사실을 시사하게

된다. 즉, CdCl₂의 경우 nifedipine, verapamil 및 diltiazem에 비해 근소포체 Ca²⁺ 유리 봉쇄작용 강도가 현저하게 약하다는 사실이다.

이러한 결론은, 외부의 Ca²⁺을 배제한 안정 상태에서 대표적인 dihydropyridine 계 Ca²⁺ 통로 효현제인 Bay K8644는 자발적인 Ca²⁺ spark를 유발시키지만, L-type Ca²⁺ 통로에 대한 결합 부위가 다른 효현제인 FPL-64176은 이러한 작용이 나타나지 않았다는 Katoh 등의 결과(2000)와 맥을 같이 하고 있다. 뿐만 아니라, Bay K 8644의 자발적 Ca²⁺ spark 유발 작용은 Bay K8644와 같은 부위에 결합하는 L-type Ca²⁺ 통로 길항제인 nifedipine에 의하여 억제되며, 동시에 근소포체 Ca²⁺ 유리 통로 봉쇄제인 ryanodine에 의하여서도 억제되었다(Mccall 등 1996; Satoh 등 1998; Katoh 등 2000). 그러므로 이들은 이러한 결과들을 바탕으로 심근에서도 골격근에서와 마찬가지로 L-type Ca²⁺ 통로가 안정 상태의 RyR의 개폐를 Ca²⁺과는 무관하게 단순히 구조적 변경에 의한 기능적 연결을 통해 조절할 수 있다는 주장을 제시하였다. 또한 Li 및 Bers(2001) 그리고 Zhu 등(1999)은 한 걸음 더 나아가 기능적 연결을 통해 심근의 RyR의 개폐 조절을 담당하는 L-type Ca²⁺ 통로의 부위는 골격근에서와 마찬가지로(Lu 등 1994; El-Hayek 등 1995; Nakai 등 1998; Li 등 1999; Henrikson 등 1999; Dulhunty 등 1999; Gurrola 등 1999; Zhu 등 1999; Lamb 등 2000) α 분절의 domain II와 domain III 사이의 세포질내 loop의 N-말단 부위라고 구체화 하였다.

이러한 보고들을 감안한다면, 본 연구의 결과 즉, CdCl₂의 경우 nifedipine, verapamil 및 diltiazem에 비해 근소포체 Ca²⁺ 유리 봉쇄작용 강도가 현저하게 약하다는 사실 역시 L-type Ca²⁺ 통로의 구조적 변경이 L-type Ca²⁺ 통로와 RyR 사이의 기능적 연결과 관련이 있다는 중요한 결론을 유추할 수 있게 된다. 실제로 심근의 L-type Ca²⁺ 통로에 있어 nifedipine의 결합 부위는 α 분절의 III5, III6, 및 IV6와 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있다(Hering 등, 1998; Striessnig 등, 1998). 또한 verapamil과 diltiazem의 경우에는 III6와 IV6에 결합 부위가 있고, 이들 결합 부위들은 nifedipine 결합 부위와는 알로스테릭 연결 관계가 있다고 알려져 있다(Hockerman 등 1997). 그러므로 nifedipine과 verapamil 및 diltiazem의 경우에는 각

각 직접적으로 L-type Ca^{2+} 통로를 봉쇄함과 동시에 직접적 혹은 알로스테릭 연결을 통하여 L-type Ca^{2+} 통로와 기능적 연결이 이루어져 있는 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로를 억제하게 될 것이다. 반면, CdCl_2 의 경우에는 수용액내에서 Cd^{2+} 이 생성되며, 이 경우에는 전하를 띠고 있음으로 인하여 L-type Ca^{2+} 통로의 α 분절 내에 형성되는 pore로 들어가서 결합하게 될 것이므로 nifedipine과 verapamil 및 diltiazem과는 다른 부위에 결합하게 될 것이다. 그러므로 본 연구 결과는, nifedipine, verapamil 및 diltiazem의 경우에는 L-type Ca^{2+} 통로의 여러 분절들 중에서 기능적 연결을 통해 RyR의 개폐를 조절하게 되는 부위에 결합하여 RyR의 개방을 봉쇄함으로써 결국 근소포체로부터 Ca^{2+} 유리가 봉쇄되고, 그 결과 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 에 의해 발생하는 내향 I_{NCX} 역시 봉쇄된 것을 의미한다. 그러나 CdCl_2 의 경우에는 RyR의 개폐를 조절하는 부위와 관련이 적은 부위에 결합함으로써 인하여 L-type Ca^{2+} 통로와의 기능적 연결을 통한 RyR의 개방이 봉쇄되지 못하고 지속적으로 발현되어 결국 근소포체로부터 Ca^{2+} 이 유리되고 그에 따라 내향성 I_{NCX} 역시 발현될 수 있었다는 것을 의미한다. 결국 본 연구의 결과는 심근에서도 골격근에서와 마찬가지로 L-type Ca^{2+} 통로가 구조적 변경에 의한 기능적 연결을 통해 RyR의 개방을 조절하고 있으며, 여기에는 nifedipine 결합 부위가 관여한다는 사실을 명확히 보여주고 있다.

제5장 결론

심근에서 L-type Ca^{2+} 통로와 ryanodine 수용체 사이의 기능적 연결의 존재 여부를 규명하기 위한 일환으로, 화학 구조가 상이하고 서로 다른 부위에 결합하여 L-type Ca^{2+} 통로를 봉쇄하는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들과 근소포체의 Ca^{2+} 유리와의 상호 관련성을 전세포 막전압 고정법을 사용하여 흰쥐의 단일 심근 세포에서 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 화학구조가 상이하고 서로 다른 부위에 결합하여 L-type Ca^{2+} 통로를 봉쇄하는 Ca^{2+} 통로 봉쇄제들인 nifedipine, verapamil, diltiazem 및 CdCl_2 는 막전압을 -40 mV에서 0 mV로 500 ms동안 사다리형 전기 자극으로 유발한 Ca^{2+} 전류를 각각 용량에 비례하여 봉쇄하였으며, 그때 최고 효능의 차이는 나타나지 않았다.

2. 전기 자극을 $+100$ mV에서 -100 mV로 200 ms에 걸쳐 -1 mV/ms의 속도로 하향시킨 ramp pulse로 전환하여 매 10 초 간격으로 자극함에 따라 흰쥐 심근 세포의 막전류는 외향전류에서 내향전류로 전환되었고, $8\sim 12$ 분 후 안정되어 -12.9 ± 0.5 pA/pF를 나타내었다. 전기자극으로 발생하는 세포내 Ca^{2+} 농도 변동은 BAPTA의 농도에 비례하여 감소되었으며 5 mM 이상에서는 완전히 소실되었다.

3. Nifedipine, verapamil 및 diltiazem은 ramp pulse로 유발되는 내향전류를 용량에 비례하여 억제하였으며 그 최고 효능은 각각 86.2 ± 2.0 %, 82.3 ± 5.1 %, 84.7 ± 3.1 % 이었다. 반면, CdCl_2 의 경우 역시 용량에 비례하여 억제하였으나 최고 효능은 73.7 ± 5.0 %로 다른 약물들에 비하여 현저히 낮았다($p < 0.05$).

4. 10 μM ryanodine은 ramp pulse로 유발되는 내향전류를 14.2 ± 2.3 % 억제하였으며, ryanodine의 이러한 봉쇄작용은 0Na 전처치로 완전히 봉쇄되었다.

5. 10 mM caffeine은 0.1 mM CdCl₂ 전처리 후 잔류 내향전류를 봉쇄하였다.

이상의 결과로 보아, 흰쥐 심근에서도 근소포체로부터의 Ca²⁺ 유리가 기존의 Ca²⁺-유발 Ca²⁺ 유리기전 이외에 L-type Ca²⁺ 통로와 ryanodine 수용체 사이의 기능적 연결을 통해서도 일어나고 있음을 알 수 있다.

참고문헌

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415: 198-205.

Bers DM, Bassani JWM, Bassani RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann NY Acad Sci* 1996; 779: 430-442.

Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 339-360.

Dulhunty AF, Laver DR, Gallant EM, Casarotto MG, Pace SM, Curtis S. Activation and Inhibition of Skeletal RyR Channels by a Part of the Skeletal DHPR II-III Loop: Effects of DHPR Ser687 and FKBP12. *Biophys J* 1999; 77: 189-203.

Edes I, Kranias EG. Ca²⁺ ATPase. In: Sperelakis N, editor. Cell physiology source book. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2001. p.271-282.

El-Hayek R, Antoniu B, Wang J, Hamilton SL, Ikemoto N. Identification of Calcium Release-triggering and Blocking Regions of the II-III Loop of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 22116-22118.

El-Hayek R, Ikemoto N. Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor 1 subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* 1998; 37:

7015-7020.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 1983; 245: C1-14.

Fill M, Copello JA. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev* 2002; 82: 893-922.

Flucher BE, Franzini-Armstrong C. Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8101-8106.

Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RHG. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 20-27.

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Comparative Ultrastructure of Ca²⁺ Release Units in Skeletal and Cardiac Muscle. *Ann NY Acad Sci* 1998; 853: 20-30.

Gurrola GB, Arevalo C, Sreekumar R, Lokuta AJ, Walker JW, Valdivia HH. Activation of Ryanodine Receptors by Imperatoxin A and a Peptide Segment of the II-III Loop of the Dihydropyridine Receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 7879-7886.

Hadley RW, Hume JR. An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea-pig myocytes. *J Physiol* 1987; 389: 205-222.

Henrikson CA, Marx SO, LI Y, Bers DM, R. MA. Cardiac Ca²⁺ channel II-III loop peptide reduced open probability of isolated SR Ca²⁺ release channel and CaSpF in ventricular myocytes. *Circ Res* 1999; 100: I-190.

Hering S, Berjukow S, Aczel S, Timin EN. Ca²⁺ channel block and inactivation: common molecular determinants. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 439-443.

Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson a, Barry D., Catterall WA. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 361-396.

Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984; 84: 705-726.

Katoh H, Schlotthauer K, Bers DM. Transmission of Information From Cardiac Dihydropyridine Receptor to Ryanodine Receptor : Evidence From BayK 8644 Effects on Resting Ca²⁺ Sparks. *Circ Res* 2000; 87: 106-111.

Lai FA, Misra M, Xu L, Smith HA, Meissner G. The ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer. *J Biol Chem* 1989; 264: 16776-16785.

Lamb GD, El-Hayek R, Ikemoto N, Stephenson DG. Effect of dihydropyridine receptor II-III loop peptides on Ca²⁺ release in skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C891-905.

Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol. (Lond)* 1985; VOL. 364: 395-411.

Li Y, Bers DM. A cardiac dihydropyridine receptor II-III loop peptide inhibits resting Ca²⁺ sparks in ferret ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 2001; 537: 17-26.

Li Y, Marx SO, Marks AR, Bers DM. Cardiac Ca²⁺ channel II-III loop peptide reduces open probability of isolated SR Ca²⁺ release channels and CaSpF in ferret ventricular myocytes. *Biophys J* 1999; 76: A463.

Lu X, Xu L, Meissner G. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 6511-6516.

McCall E., Hryshko L. V., Stiffel V. M., Christensen D. M., Bers D. M. Possible Functional Linkage Between the Cardiac Dihydropyridine and Ryanodine Receptor: Acceleration of Rest Decay by Bay K 8644. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 79-93.

Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol Cell Physiol* 1985; 249: H1056-60.

Narayanan N, Xu A. Phosphorylation and regulation of the Ca-pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent

protein kinase. *Basic Res Cardiol* 1997; 92 Suppl : 25-35.

Reeves J, Hale C. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* 1984; 259: 7733-7739.

Satoh H, Katoh H, Velez P, Fill M, Bers DM. Bay K 8644 increases resting Ca spark frequency in ferret ventricular myocytes independent of Ca influx: Contrast with caffeine and ryanodine effects. *Circ Res* 1998; 83: 1192-1204.

Scriven DRL, Dan P, Moore EDW. Distribution of protein implication in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2000; 79: 2682-2691.

Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ, Glossmann H. Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 108-115.

Toyofuku T, Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH. Identification of Ser as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase that is phosphorylated by Ca/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 26492-26496.

Weber CR, Piacentino V, III, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na⁺-Ca²⁺ Exchange Current and Submembrane [Ca²⁺] During the Cardiac Action Potential. *Circ Res* 2002; 90: 182-189.

Wier WG, Balke CW. Ca²⁺ Release Mechanisms, Ca²⁺ Sparks, and Local Control of Excitation-Contraction Coupling in Normal Heart Muscle. *Circ Res*

1999; 85: 770-776.

Zhu X, Gurrola G, T. JM, Walker JW, Valdivia HH. Conversion of an inactive cardiac dihydropyridine receptor II-III loop segment into forms that activate skeletal ryanodine receptors. *FEBS Letter* 1999; 450: 221-226.

ABSTRACT

Comparison between Ca^{2+} channel blockers of myocardial SR Ca^{2+} release blocking action

Ahn, Sung Wan

Dept. of Medicine

The Graduate School

Yonsei University

Sarcoplasmic reticulum is the major source of the activator Ca^{2+} in heart and skeletal muscle. In the heart, sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release is triggered by the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism, in which a small amount of external Ca^{2+} entered the cell through L-type Ca^{2+} channel opens the ryanodine receptor, a sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release channel. Contrastingly in the skeletal muscle, sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release is triggered by the L-type Ca^{2+} channel itself without requiring external Ca^{2+} influx. Conformational change in the L-type Ca^{2+} channel during an action potential directly opens the ryanodine receptor through a functional linkage. The functional linkage is possible in the skeletal muscle, because L-type Ca^{2+} channels physically contact with opposing ryanodine receptors in 4:1 ratio. Recently, several reports have raised the possibility of the functional linkage between L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor in the heart by showing the physical contact between L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor although the coupling ratio was much low (1:10 vs. 4:1).

Therefore, this study was performed to clarify the presence of an functional linkage between L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor in the heart. To achieve this aim, differential suppression of the sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release was pharmacologically pursued between the Ca^{2+} channel blockers with different chemical structure and different binding sites on the L-type Ca^{2+} channel by using whole cell-mode patch-clamp technique in the enzymatically isolated single rat ventricular myocytes. The results were as follows;

1. Ca^{2+} channel blockers with different chemical structure and different binding site on L-type Ca^{2+} channel such as nifedipine, verapamil, diltiazem and CdCl_2 suppressed the Ca^{2+} current induced by a step pulse from holding potential of -40 mV to 0 mV for 500 ms in a concentration-dependent manner.

2. During the stimulation with a ramp pulse from $+100$ mV to -100 mV for 200 ms every 10 s in the rat ventricular myocytes held at -40 mV, the initial outward current was gradually turned into an inward current. The maximal inward current after equilibration, which required $8\sim 12$ min, became -12.9 ± 0.5 pA/pF. Cytosolic Ca^{2+} concentration raised by the ramp pulse decreased in a BAPTA concentration-dependent manner and was completely abolished above 5 mM.

3. Nifedipine, verapamil and diltiazem suppressed the ramp pulse-induced inward current in a concentration-dependent manner and the maximal suppressions were 86.2 ± 2.0 %, 82.3 ± 5.1 %, and 84.7 ± 2.0 %, respectively. CdCl_2 also suppressed the inward current in a concentration-dependent manner. In the case of CdCl_2 , however, the maximal suppression was significantly lower than those of other Ca^{2+} channel blockers, eliciting

73.7±5.0 % (p<0.05).

4. 10 μ M ryanodine suppressed the ramp pulse-induced inward current by 14.2±2.3 %, which was completely blocked by 0Na pretreatment.

5. 10 mM caffeine blocked the remaining inward current after 0.1 mM CdCl₂.

From these above results, it is concluded that sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release is also triggered by the functional linkage between L-type Ca²⁺ channel and ryanodine receptor in addition to the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism in the rat heart.

Key word: L-type Ca²⁺ channel, Sarcoplasmic reticulum(SR), ryanodine receptor, Ca²⁺ channel blocker, Ca²⁺-induced Ca²⁺ release