

심실근세포에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환에
의한 L-type Ca^{2+} 전류 조절 기전

연세대학교 대학원

의 학 과

안 성 완

심실근세포에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환에
의한 L-type Ca^{2+} 전류 조절 기전

지도 고 창 만 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

안 성 완

안성완의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 12월 일

감사의 글

저를 학문의 길로 인도해주시고 본 연구를 진행함에 있어 아낌없는 지도와 세심한 배려를 베풀어 주신 고창만 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 논문의 심사위원으로서 많은 지도와 조언을 해주신 공인덕 교수님, 이승환 교수님, 예병일 교수님, 유병수 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

약리학교실에서 생활하면서 많은 배려를 해주신 최재원 교수님께 감사드리며 그리고 연구의 진행에 있어서 실험동물을 관리해 주신 서상건 선생님과 약리학교실 선생님들에게도 감사드립니다.

저를 늘 아끼고 사랑해 주신 최종환 교수님께 이 지면을 빌어 진심으로 감사드립니다. 그리고 생소한 전기 생리학 실험에 대해 조언 해주신 정성우 교수님과 생리학교실 선생님께도 감사드립니다.

늘 노심초차 둘째 아들을 걱정하시고 허물을 사랑으로 감싸 주신 어머니께 고개 숙여 감사드립니다.

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

부족한 사람이 이제 작은 결실을 맺고 새롭게 첫발을 내딛으려 합니다. 작은 결실이라도 많은 노력과 인내와 주위의 도움으로 얻을 수 있다는 것을 배웠습니다. 작은 결실을 맺기 위해 도움을 주신 모든 분에게 하느님의 은총과 사랑이 있기를 간절히 기원합니다.

2006 년 12 월

저자 씀

차 례

그림 차례	ii
국문 요약	iv
제 1 장. 서론	1
제 2 장. 재료 및 방법	8
2.1. 단일 심실근세포의 분리	8
2.2. 전기 생리학 실험	9
2.3. 실험 용액 및 시약	9
2.4. 단일 심근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정	10
2.5. 시약	10
2.6. 자료 분석	11
제 3 장. 결과	12
3.1. L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 효과	12
3.2. 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 CDI 제거 후 0Na의 효과	15
3.3. BayK 8644와 isoproterenol의 CDI 제거 효과	17
3.4. BayK 8644와 isoproterenol 처치 후 0Na의 효과	19
3.5. 0Na으로 억제된 Ca^{2+} 전류의 탈분극 시간에 따른 변화	22
3.6. 0Na으로 억제되는 전류의 특성	24
3.7. 토끼와 기네피에서 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 영향	26
3.8. 토끼와 기네피의 심실근세포에서 0Na으로 억제되는 Ca^{2+} 전류의 탈분극 시간에 따른 변화	37
3.9. 근소포체의 ryanodine 수용체와 NCX의 상호작용	38
제 4 장. 고찰	40
제 5 장. 결론	50
참고 문헌	52
영문 요약	64

그림 차례

그림 1.	흰쥐 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제	14
그림 2.	흰쥐 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄가 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향	16
그림 3.	흰쥐 심실근세포에서 L-type Ca^{2+} 전류의 Ca^{2+} 의존적 불활성에 대한 BayK 8644와 isoproterenol의 비교	18
그림 4.	Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 흰쥐 심실근세포에서 isoproterenol에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화	20
그림 5.	Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 흰쥐 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화	21
그림 6.	흰쥐 심실근세포에서 0Na으로 억제된 실제 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화	23
그림 7.	Ca^{2+} 을 Ba^{2+} 으로 치환시 Na^+ 배제가 미치는 영향	25
그림 8.	토끼 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제	28
그림 9.	토끼 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄가 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향	29
그림 10.	Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 토끼 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화	30
그림 11.	토끼 심실근세포에서 0Na으로 억제된 실제 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화	31
그림 12.	기넉픽 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제	32

그림 13. 기넷픽 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄가 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향	33
그림 14. Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 기넷픽 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화	34
그림 15. 기넷픽 심실근세포에서 0Na으로 억제된 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화	35
그림 16. 토끼와 기넷픽 심실근세포에서 BayK 8644가 L-type Ca^{2+} 전류의 Ca^{2+} 의존적 불활성 완화 작용	36
그림 17. 근소포체 유리 Ca^{2+} 으로 발생한 내향 NCX 전류에 BAPTA가 미치는 영향	39

심실근세포에서 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 조절 기전

심장에서 L-type Ca^{2+} 통로는 막전압의 탈분극에 의해 활성화되어 세포안과 밖의 Ca^{2+} 농도차에 의해 세포 외부로부터 세포 내부로 Ca^{2+} 을 들어오게 하는 주요한 Ca^{2+} 유입통로이고 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 교환($\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger; NCX)은 한 분자의 Ca^{2+} 을 세분자의 Na^+ 과 맞교환하며 세포내 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 배출하는 주요한 Ca^{2+} 배출기전이며 이완 유발 기전이다. 최근에 NCX를 over expression 시킨 동물 모델과 cardiac specific knock out 시킨 동물 모델에서 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로의 Ca^{2+} 의존적 불활성(Ca^{2+} -dependent inactivation; CDI)을 조절할 가능성이 제시되었다. 그러므로 본 연구에서는 심장에서 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX의 상호작용을 규명하기 위해 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX가 같은 Ca^{2+} micro-domain에 존재하고 있는지를 확인하고 아울러 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX의 활성이 상이한 흰쥐, 토끼, 기닉픽에서 Ca^{2+} micro-domain에 존재하는 NCX의 비율을 추구함으로써 중간 차이를 비교하고자 하였다. 이러한 목적을 달성하기 위해 효소로 분리한 심실근세포에서 whole-cell patch clamp를 시행하였고, NCX의 영향은 BAPTA가 존재할 때와 존재하지 않을 때에 탈분극 자극으로 발생한 L-type Ca^{2+} 전류에서 Na^+ 을 배제한 약물용액(0Na)으로 NCX를 봉쇄한 후 억제되는 전류로 관찰하였다. 이와 같은 실험으로 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 흰쥐 심실근세포에서 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 $45.3\pm 4.3\%$ 억제하였고, 0Na으로 억제되는 실제 전류는 10 ms 근처에서 피크를 이루었다.
2. Ryanodine 처치로 근소포체의 Ca^{2+} 유리를 봉쇄할 경우 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량은 $62.0\pm 22.4\%$ 증가하나, 0Na은 여전히 전하 유입량을 $48.8\pm 7.7\%$

억제하였다. 이때 0Na으로 억제되는 실제 전류는 10 ms 근처에서 이루어지는 첫 번째 피크에 이어 새로이 20 ms 근처에서 두 번째 피크를 발생하였다.

3. 10 mM BAPTA 처치는 흰쥐 심실근세포내 Ca^{2+} transient를 완전히 사라지게 하였으나, 0Na으로 봉쇄되는 전류를 완전히 봉쇄하지는 못하였다. 특히 0Na으로 봉쇄되는 실제 전류에서 나타나는 첫 번째 피크는 억제하지 않는 반면, ryanodine 처치로 발생하는 두 번째 피크는 완전히 봉쇄하였다.
4. Ryanodine 전처치로 새로이 발생하는 두 번째 피크는 isoproterenol 처치로 더 크게 증가하였지만, BayK 8644 처치 시에는 그 크기가 오히려 억제되며 오른 쪽으로 이동되었다. 반면, 두 약물은 10 mM BAPTA 처치시 잔류하는 전류를 증가시켰으며, 결과적으로 0Na으로 봉쇄되는 전체 전류에서 BAPTA로 억제되지 않는 전류의 비율은 BayK 8644 처치 후 38.6%에서 64.2%로 증가하였다.
5. 토끼와 기넌픽의 경우 0Na으로 봉쇄되는 실제 전류는 흰쥐에서와는 달리 대조군에서 이미 2개의 피크를 이루었다. Ryanodine 처치는 두 번째 피크를 증가시켰고, isoproterenol 및 BayK 8644 처치는 흰쥐와 유사한 반응을 나타내었으나, BayK 8644 처치 후 최대가 되는 BAPTA로 억제되지 않는 전류의 비율이 토끼와 기넌픽에서 각각 31.4%와 19.9%로 흰쥐에서보다 감소하였다.

이상의 결과로부터, NCX는 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적 Ca^{2+} micro-domain 내에 적어도 흰쥐, 토끼, 기넌픽에서 각각 64%, 31%, 20%가 존재함으로써 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 유발 작용이 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 보다 더 우수한 작용을 발현하는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 을 배출하면서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 조절하고 있다는 결론을 얻었다.

핵심되는 말: Na^+ - Ca^{2+} 교환, L-type Ca^{2+} 통로, Ca^{2+} 의존적 불활성, BAPTA, Ryanodine, BayK 8644, Caffeine.

심실근세포에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 조절 기전

<지도 고 창 만 교수>

연세대학교 대학원 의학과

안 성 완

제1장 서론

심장에서 Ca^{2+} 은 전기적 신호를 매개하는 전달자이며 수축요소인 myofilament의 직접적인 활성인자이다(Bers, 2001). 심장의 수축은 세포내 활성 Ca^{2+} 과 myofilament의 상호 작용으로 발생하기 때문에 심근의 수축력은 세포내 활성 Ca^{2+} 농도에 따라 비례하여 증가한다(Bers 2002; Solaro 및 Rarick, 1998). 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 은 심장의 활동전압 기간 동안 주로 막전압 의존적 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 세포 안과 밖의 Ca^{2+} 의 농도 차이에 의해 세포 외부로부터 세포 내로 유입되며 이렇게 유입된 소량의 Ca^{2+} 은 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로인 ryanodine 수용체(ryanodine receptor; RyR)를 활성화시켜 근소포체에 저장되어 있는 다량의 Ca^{2+} 을 세포질 내로 유리하게 한다. 이와 같이 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의해 근소포체로부터 Ca^{2+} 이 유리되는 기전을 Ca^{2+} -유발 Ca^{2+} 유리(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; CICR) 기전이라고 한다(Fabiato, 1983). 심장에서 CICR은 근막의 함입으로 형성된 t-tubule 내에 L-type Ca^{2+} 통로가 집중되어 있고 근소포체의 ryanodine 수용체가 L-type Ca^{2+} 통로와 매우 가까이에 인접하여 존재함으로써 가능하게 된다(Stern, 1992; Wibo 등, 1991; Kawai 등, 1999). T-tubule안에서 L-type Ca^{2+} 통로를 포함하는 근막과 L-type Ca^{2+} 통로와 가까이 마주하고 있는 ryanodine 수용체를 포함하는 근소포체막은 dyad라는 구조를 이루게 되고 이러한 막 사이에 형성된 공간을 dyadic cleft라고 한다(Carl 등, 1995;

Sun 등, 1995). 세포 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 은 세포질 내로 확산되어 결국 심근의 수축요소인 myofilament를 활성화시켜 수축을 유발하게 된다. 이와 같이 심근에서 전기적 활성이 Ca^{2+} 에 의해 매개되어 기계적 수축을 유발하는 과정을 흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling, E-C coupling)이라고 한다(Bers, 2002).

심근의 수축기 동안 증가한 세포내 Ca^{2+} 은 세포질로부터 제거됨으로써 심근 이완을 유발하게 된다(Bers 2002). 심근 이완기 동안 세포내 Ca^{2+} 의 항상성을 유지하기 위하여 내부에서 유리된 Ca^{2+} 양과 동일한 양의 Ca^{2+} 은 다시 내부로 재섭취되어야 하며 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 양과 동일한 양의 Ca^{2+} 은 세포 밖으로 배출되어야 한다. 근소포체의 Ca^{2+} 재섭취는 근소포체막의 Ca^{2+} -ATPase를 통해 이루어지며 세포 밖으로의 Ca^{2+} 배출은 근막의 Na^+/Ca^{2+} 교환체(Na^+/Ca^{2+} exchanger ; NCX)와 근막의 Ca^{2+} -ATPase를 통해 이루어지고 있다. 하지만 세포 밖으로의 Ca^{2+} 배출속도는 근막의 Ca^{2+} -ATPase의 경우 $1 \mu M/sec$ 이하인 반면에 NCX의 경우 $30 \mu M/sec$ 로 근막의 Ca^{2+} -ATPase 보다 월등히 높은 속도로 Ca^{2+} 을 배출한다. 그러므로 심근에서 NCX는 가장 중요한 Ca^{2+} 배출 기전이며 또한 이완 유발 기전이다(Bers, 2001). 한편 근소포체의 Ca^{2+} 유리는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 양에 비례하여 증가하게 되며 NCX의 활성 변동은 Ca^{2+} 배출의 변동을 초래하게 되므로 궁극적으로 이러한 Ca^{2+} 수송 단백질의 활성 변화는 심근 세포내 Ca^{2+} 농도를 변동시켜 수축의 변동을 초래하게 된다(Fabiato, 1985; Hasenfuss, 1998; Mattiello 등, 1998). 따라서 L-type Ca^{2+} 통로의 기능 및 NCX 활성 조절 기전은 심근의 수축을 조절하는 직접적인 요소가 된다. 실제로 Ca^{2+} 통로 봉쇄제는 심장의 부정맥 치료제로 사용되고 있으며 digitalis 계통의 약물은 간접적으로 NCX에 의한 Ca^{2+} 배출을 억제하여 심장 수축력을 강화시킨다(Smith, 1988).

L-type Ca^{2+} 통로의 조절에 있어 cAMP 의존적 단백질 키나아제(PKA)에 매개되는 L-type Ca^{2+} 통로의 인산화(phosphorylation)는 L-type Ca^{2+} 통로의 Ca^{2+} 유

입을 크게 증가시킨다(Mcdonald 등, 1994; Keef 등, 2001). 그러므로 심근에서 β -아드레날린성 자극에 의한 cAMP의 증가는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 세포외부로부터 Ca^{2+} 유입을 증가시키는 중요한 기전이다. 뿐만 아니라 L-type Ca^{2+} 통로 조절에 있어 또 다른 중요한 기전으로 L-type Ca^{2+} 통로 주위의 Ca^{2+} 농도 증가에 의해 L-type Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입이 억제되는 기전이 존재한다. 이는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 으로 인하여 발생할 수 있는 세포내 Ca^{2+} 의 과충전을 방지하기 위한 중요한 기전으로 이를 Ca^{2+} 의존적 불활성(Ca²⁺-dependent inactivation; CDI)이라고 한다(Isenberg, 1977; Kass 및 Sanguinetti, 1984; Lee 등, 1985). L-type Ca^{2+} 통로에서 CDI를 유발하기 위한 Ca^{2+} 의 결합 위치는 Ca^{2+} 통로의 pore를 형성하고 있는 $\alpha_1\text{c}$ 소단위의 C-말단에 존재하고 있으며 calmodulin에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다(Stotz 및 Zamponi, 2001; Anderson 2001; Soldatov, 2003). 심근에서 L-type Ca^{2+} 통로 및 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로인 ryanodine 수용체 모두 dyadic cleft 내에 존재하고 있기 때문에 심근에서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 과 CICR 기전에 의해 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도를 증가시킴으로써 발생하는 것으로 알려져 있다(Spido 등 1995; Adachi-Akahane 등, 1996; Sham 1997; Delgado 등, 1999; Linz 및 Meyer, 2000). 심근에서 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 의 양은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 의 양보다 월등히 많기 때문에 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 훨씬 더 크게 영향을 미칠 것이다. 실제로 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 전체 CDI의 60%이상 관여하는 것으로 알려져 있다(Adachi-Akahane 등, 1996).

한편 NCX는 세포막을 사이에 두고 Na^+ 과 Ca^{2+} 의 농도차에 의해 발생하는 전기화학적 격차를 원동력으로 하여 세 분자의 Na^+ 과 한 분자의 Ca^{2+} 을 맞교환하는 기전이다(Kimura 등, 1986; Mechmann 및 Pott, 1986; Bridge 등, 1990). 따라서 NCX는 이동되는 전하의 차이에 의해 초과되는 한 분자의 Na^+ 의 이동방향으로 NCX 전류를 발생하게 된다. NCX에 의한 Ca^{2+} 이동은 세포 내외의 Na^+ 과 Ca^{2+} 의

농도 뿐만 아니라 막전압(membrane potential ; E_m)에 의해서도 영향을 받는다. 따라서 막전압이 NCX의 평형전압($E_{Na/Ca} = 3E_{Na} - 2E_{Ca}$; E_{Na} 와 E_{Ca} 은 Na^+ 과 Ca^{2+} 의 평형전압(equilibrium potential)이다)보다 더 높을 때($E_m > E_{Na/Ca}$)에는 외향 NCX 전류가 발생하여 Ca^{2+} 을 세포 내로 유입시키고 반면에 막전압이 NCX의 평형 전압보다 더 낮을 때($E_m < E_{Na/Ca}$)에는 내향 NCX 전류가 발생하여 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 배출시킨다(Bers, 2002). 이와 같이 NCX는 세포막을 사이에 두고 Ca^{2+} 과 Na^+ 의 농도 그리고 막전압에 따라 양방향으로 Ca^{2+} 을 이동시킬 수 있다. 실제로 심장에서 활동전압 초기에는 막전압이 NCX의 평형 전압을 초과하므로 일시적으로 NCX는 Ca^{2+} 유입 기전으로 작용하는 것으로 알려져 있다(weber 등 2002). 그러나 대부분의 활동전압 기간에는 Ca^{2+} 을 배출시키는 기전으로 작용한다. 활동전압 초기에 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 보다 매우 적기 때문에 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 처럼 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 효율적으로 유리할 수 있는지에 대해서는 아직 명확하지 않다(Bouchard 등, 1993a,b; Sham 등, 1995; Sipido 등, 1997; Litwin 등, 1998; Leblanc 및 Hume, 1990; Ritter 등, 2003). 따라서 심장에서 NCX는 비록 활동 전압 초기에 일시적으로 Ca^{2+} 을 유입할 수 있다 하더라도 주로 Ca^{2+} 의 배출기전으로 작용하고 있고 NCX를 통한 Ca^{2+} 의 배출은 세포 내로의 Ca^{2+} 유입과 균형을 맞추으로써 세포내 Ca^{2+} 항상성을 유지하게 된다(Adachi-Akahane 등 1997; Terracciano 등, 1988; Yao 등, 1998).

한편 최근에 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로의 활성화에 영향을 줄 가능성이 보고되어 NCX와 L-type Ca^{2+} 통로 상호간의 조절 가능성이 제시되었다. 즉 NCX를 homozygous overexpression시킨 동물모델에서 근소포체의 Ca^{2+} 양이 변화되지 않았음에도 불구하고 L-type Ca^{2+} 전류의 최대 피크가 크게 증가되었다(Reuter 등, 2004). 이러한 L-type Ca^{2+} 전류의 최대 피크의 증가는 NCX가 Ca^{2+} 배출 기전으로 강하게 작용할 수 있는 막전압에서 특히 뚜렷하였다. 이와 대조적으로 NCX를 tissue specific knockout시킨 동물모델에서는 L-type Ca^{2+} 전류의 최대 피크가 상당량(50%) 감소되었다(Henderson 등, 2004; Pott 등, 2006). 그렇지만 두 경우의

연구에서 L-type Ca^{2+} 통로의 단백질 발현량의 변화는 관찰되지 않았으며, 또한 다른 Ca^{2+} 수송 단백질인 근소포체의 Ca^{2+} -ATPase와 ryanodine 수용체 그리고 근막의 Ca^{2+} -ATPase의 발현량의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 이와 같이 NCX가 L-type Ca^{2+} 전류에 영향을 줄 수 있는 가장 가능성이 있는 가설로 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로 주위의 Ca^{2+} 농도를 증가시키거나 감소시킴으로서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 항진 혹은 약화시킬 수 있다는 것이다(Pott 등, 2006). 그러나 이 경우 심근에서 L-type Ca^{2+} 통로는 주로 dyadic cleft 내에 존재하고 있기 때문에 NCX가 L-type Ca^{2+} 전류에 영향을 미치기 위해서는 NCX 역시 L-type Ca^{2+} 통로와 같이 dyadic cleft 내에 존재하여 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도를 변동 시켜야 할 것이다. 하지만 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 dyadic cleft 내에 존재하는지에 대해서는 아직 명확하지 않다. 형광 염색을 통한 면역조직학적 연구에서 일부 연구자들은 NCX가 주로 T-tubule에 존재하고 있는 것으로 보고 하였지만(Frank 등, 1992) 다른 연구자들은 NCX가 근막 전체에 분포하고 있는 것으로 보고하였다(Musa 등, 2002; Kieval 등 1992). 한편 최근에 de-tubulation을 이용한 연구에서 de-tubulation후 NCX의 활성이 상당량 감소되는 결과를 얻음으로서 NCX가 적어도 t-tubule에 주로 존재하는 것으로 받아들여지고 있다(Yang 등, 2002; Brette 등, 2002; Fowler 등, 2004). 그러나 NCX가 t-tubule내 중에서도 dyadic cleft 안에 존재하고 있는지에 대해서는 현존하는 광학적 측정방법의 해상도를 크게 벗어나 있어 실제적으로 확인이 불가능하다(Scriven 등 2000; Brette 및 Orchard, 2003). 이러한 혼란은 기능적 연구의 결과에서도 마찬가지인 실정이다. 초기 연구에서 L-type Ca^{2+} 통로 봉쇄제를 사용하여 L-type Ca^{2+} 통로를 봉쇄한 후 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리할 수 있는 가능성을 보여 주었다(Kohmoto 등, 1994; Levi 등, 1994; Grantham 및 Cannell, 1996; Leblanc 및 Hume, 1990). 만약 NCX에 의한 CICR이 사실이라면 이러한 현상은 NCX가 ryanodine 수용체에 인접하여 존재할 때에 비로소 가능할 것이므로 NCX의 dyadic cleft 내 존재를 뒷받침하게 된다. 하지만 다른 연구자는 caffeine을 처치하여 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리하였을 때 NCX를 통한 Ca^{2+} 의 배출이 고농도의 Ca^{2+} 완충제에 의해 완벽히 억제됨으로써 NCX가 ryanodine 수용체의 Ca^{2+}

micro-domain과 기능적으로 분리되어 있다고 보고한 바 있다(Adachi-Akahane 등 1996).

한편 심근 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 의 공급에 있어 세포 외부로부터 유입되는 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 의 비율이 종에 따라 차이가 나며 또한 세포 내 Ca^{2+} 항상성을 유지하기 위해 NCX를 통해 배출되는 Ca^{2+} 의 양에도 차이가 있음은 잘 알려진 사실이다(Bers 2002; Bers 등 1996). 흰쥐, 생쥐와 같은 동물에서는 외부로부터 유입되는 Ca^{2+} 이 8~10%, 내부로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 90~92%에 이르는 것으로 알려져 있는 반면에 토끼, 족제비, 개, 고양이, 기넌픽 등에서는 외부로부터 유입되는 Ca^{2+} 이 28~30%, 내부로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 70~72%에 이르는 것으로 알려져 있다. 이완기 동안 세포내 Ca^{2+} 항상성을 유지하기 위해 세포 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 은 세포 밖으로 배출되어야 하기 때문에 토끼, 족제비, 개, 고양이, 기넌픽 등의 심근 세포에서는 NCX를 통해 28~30%가 세포 밖으로 배출되어야 하며 흰쥐와 생쥐의 심근 세포에서는 NCX를 통해 8~10%가 배출되어야 한다. 하지만 최대 수축력에 필요한 세포내 활성 Ca^{2+} 농도는 1 μ M 정도로 종간 차이가 없으며 또한 막전압을 고정된 후 탈분극 자극에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 크기와 전하 유입량은 큰 차이를 보이지 않는다(Josephson 등, 1984; Varro 등, 1993; Isenberg 및 Klockner, 1982; Matuda 및 Noma, 1984). 결국 이와 같은 종간 활성 Ca^{2+} 비율의 차이는 NCX의 활성의 차이에 기인할 가능성이 높다고 할 수 있다(Sham 등, 1995; Bers 2002).

만약 NCX가 dyadic cleft 내에 존재하고 dyadic cleft 내에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 NCX에 의해 배출된다면 NCX가 심근 수축 조절에 있어 중요한 역할을 담당하게 될 것이다. 즉 dyadic cleft 내에서 NCX의 활성은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 을 배출하여 실제 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 량을 감소시키게 될 것이고 결국 수축 강도에 영향을 미치게 될 것이다. 또한 NCX를 통한 Ca^{2+} 의 배출은 dyadic cleft 내에 Ca^{2+} 농도를 낮추게 됨으로서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 효

과를 감소시키게 될 것이다. 결국 dyadic cleft 내에 NCX의 활성화는 수축에 필요한 활성화 Ca^{2+} 의 증가 속도를 조절 하게 됨으로써 심근의 이완 기전 외에 심근의 수축 강도를 조절하는 중요한 역할을 담당하게 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 심장의 수축 기전에서 NCX와 L-type Ca^{2+} 통로의 상호 작용을 규명하기 위해서 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX가 같은 Ca^{2+} micro-domain에 존재하는지를 확인하고 아울러 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX의 활성화가 상이한 흰쥐, 토끼, 기넌픽에서 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 Ca^{2+} micro-domain에 존재하는 NCX 비율을 추구함으로써 중간 차이를 규명해 보고자 하였다. 이러한 목적을 달성하기 위해 효소로 분리한 심실근세포는 전기 생리학적 방법을 이용하여 L-type Ca^{2+} 전류를 발생하였고 Ca^{2+} 을 배출하면서 발생하는 내향 NCX 전류는 약리학적 방법을 이용하여 L-type Ca^{2+} 전류에서 Ca^{2+} 의존적 CDI를 제거함으로써 직접 분리하였다. 또한 고농도의 BAPTA를 사용하여 Ca^{2+} 의 확산을 제한함으로써 Ca^{2+} 의 반응을 국소 부위 영역으로 국한 시켰다. 그리하여 고농도 BAPTA가 존재할 때와 존재하지 않을 때에 NCX의 내향 전류를 비교함으로써 직접적으로 NCX의 활성화 비율을 분석하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 단일 심실근 세포의 분리

본 실험에서는 체중 250 g 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley rat)와 기넛픽 그리고 2.5 kg 내외의 토끼를 사용하여 효소 분리 방법에 따라 심실근세포를 분리하였다 (Mitra와 Morad,1985). 모든 종은 heparin 500 IU/kg을 복강 내 주사로 전처치한 후 pentobarbital sodium 50 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취를 유도하였다. 대동맥 기시부를 보존한 상태로 적출한 심장은 Ca^{2+} 이 제거된 Tyrode 용액에 담근 다음 부드럽게 두 세 차례 짜주어 심실내의 혈액을 제거하였다. 이어 빠른 시간 내에 대동맥에 관을 삽입한 후 peristaltic pump를 이용하여 Ca^{2+} 이 제거된 Tyrode 용액을 흰쥐와 기넛픽은 분당 6 ml, 토끼는 분당 25 ml의 관류 속도로 심근 조직 내로 관류시켰다. 8분 후 Ca^{2+} 이 제거된 Tyrode 용액에 흰쥐는 1 mg/ml의 collagenase A(activity>0.15 U/mg, Roche, Mannheim, Germany)와 0.1 mg/ml protease(type XIV, Sigma, Louis, USA), 기넛픽은 1 mg/ml의 collagenase B(activity>0.15 U/mg, Roche, Mannheim, Germany) 그리고 토끼는 0.9 mg/ml collagenase type 2(activity 274 U/mg, Worthington, Lakewood, USA)와 0.4 mg/ml protease(type XIV, Sigma, USA)을 첨가하여 15분간 관류시킴으로써 심근 내 결합조직을 분해시켰다. 효소 처치 후 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액으로 바꾸어 6 분간 관류함으로써 심근 조직 내 효소를 씻어내었다. 이 후 심실근조직 부위만 떼어내어 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액이 들어있는 petri dish로 옮겨 해부 가위로 조직을 길이 방향으로 흠집을 낸 후 부드럽게 흔들어 단일 심실근세포를 분리하였다. 분리된 심실근세포는 실온에서 보관하였으며, 분리 후 10시간 이내에 사용하였다. 심실근세포 분리는 37°C에서 수행하였고 분리에 사용한 용액은 모두 100% 산소로 포화시켰다. 본 실험에 사용한 Tyrode 용액의 조성(mM)은 136 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 0.99 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose이고 충분히 교반한 후 1 N NaOH로 pH를 7.4로 적정하여 사용하였다.

2.2. 전기 생리학 실험

전기 생리학 실험은 Axopatch 200B(Axopatch 200B, Axon instrument, Foster city, USA)를 사용하여 whole-cell patch clamp를 구성하여 막전류를 측정하였다. 독립현미경 위에 설치된 patch chamber로 분리한 심실근세포를 분주한 다음 10분 동안 세포를 안정시킨 후 Tyrode 용액으로 실험 전과정 동안 분당 3 ml의 속도로 관류시켰다. 약물은 빠른 약물 전환 방법(fast drug switching method; Lee Co, USA)를 사용하여 심실근세포에 최대한 접근하여 처치하였다. 막전류 측정에 사용하는 미세유리전극은 microelectrode puller(P-97, Sutter Inc, Novato, CA, USA)를 사용하여 직경 1.5 mm 유리관(BF150-117-10, Sutter Inc, Novato, CA, USA)의 첨끝을 직경이 1.5 μm 정도가 되게 제작하였고 미세유리전극의 거친 첨끝은 microfuge(MF-83, Narishige, Japan)을 사용하여 매끈하게 열처리하였다. Whole-cell patch clamp의 형성은 수력식 미세조작기(Hydraulic micromanipulator MHW-3, Narishige, Japan)를 사용하여 미세유리전극을 심실근세포에 접촉시켜 giga seal를 형성한 후 가벼운 음압을 가하여 미세유리전극과 접촉된 근세포막을 파열시켜 형성하였다. 측정된 전류를 세포 크기에 따라 보정하기 위해 근세포의 축전전류(capacitance current)를 10 mV 크기로 과분극을 시킨 상태에서 Pclamp 9 software(Axon instrument, Foster city, USA)를 사용하여 측정하였다. 전극용액이 세포질로 확산되도록 충분히 기다린 다음 막전압을 -60 mV로 고정된 후 0 mV로 200 ms 동안 탈분극 자극을 주어 Ca^{2+} 전류를 유발하였고 탈분극 자극으로 발생한 전류가 안정될 때까지 기다린 다음 실험을 진행하였다.

2.3. 실험 용액 및 시약

실험에 사용한 전극용액의 구성(mM)은 9 NaCl, 105 CsCl, 0.035 CaCl_2 , 5 ATP-Mg, 20 tetraethylammonium chloride(TEA-Cl), 0.1 cAMP, 0.2 fura-2 pentasodium 이며 pH는 CsOH를 사용하여 7.2로 적정하였다. CsCl와 TEA-Cl은 K^+ 전류를 억제하기 위해 첨가하였으며. cAMP는 L-type Ca^{2+} 통로의 활성을 증가시켜 L-type Ca^{2+} 전류를 증가시키기 위해 첨가하였다. Ca^{2+} 의 확산을 제한하기

위한 실험에는 0.2 mM fura-2 pentasodium 대신에 전극용액에 10 mM BAPTA를 첨가하였다. 두 전극 용액의 세포내 Na^+ 농도는 10 mM이 되도록 조정하였고 세포내 Ca^{2+} 농도는 Winmax C v2.5(stanford University, USA)를 사용하여 90 nM이 되도록 조절하였다. 두 전극 용액의 최종 삼투압 농도는 300~305 mOsm이 되도록 sucrose를 이용하여 조절하였다.

실험에 사용한 약물 용액은 K^+ 전류를 억제하기 위하여 Tyrode 용액에서 5.4 mM KCl를 제거하였고 Na^+ 전류를 억제하기 위해 10 μM TTX를 첨가하였으며, Cl^- 전류를 억제하기 위하여 0.1 mM DIDS 를 첨가하여 사용하였다. 0Na을 배제한 용액(0Na)은 약물 용액의 NaCl를 LiCl로 대체하여 Na^+ 를 제거하였다.

2.4. 단일 심근 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

분리한 심실근세포는 독립형광현미경 위에 설치된 patch chamber로 분주한 다음 0.2 mM fura-2 pentasodium이 포함된 표준 전극 용액을 사용하여 whole-cell mode patch를 형성한 후 측정하였다. 10 mM BAPTA가 포함된 전극용액에는 0.2 mM fura-2 pentasodium을 첨가하여 측정하였다. 탈분극 자극을 주는 동안 세포질내의 Ca^{2+} 농도 변화는 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 시킨 후 이 때 방사되는 에너지를 510 nm의 방사파장에서 Felix software(photon technology International Inc, Lawrenceville, NJ, USA)로 검출하여 340 nm/380 nm 비율의 형광세기를 측정하였다.

2.5. 시약

결체조직 분해효소인 collagenase A와 collagenase B는 Boehringer Mannheim, collagenase type 2는 Worthington, 그리고 protease type XIV는 Sigma로부터 구입하였다. 그리고 마취를 유도하기 위해 사용한 heparin(국산)과 pentobarbital sodium(국산)은 국내제조회사에서 구입하였다. Tyrode 용액의 제조에 사용한

약물과 ryanodine 수용체 봉쇄제인 ryanodine과 L-type Ca^{2+} 통로 길항제인 nimodipine 그리고 isoproterenol은 Sigma로부터 구입하였고 L-type Ca^{2+} 통로 효현제인 Bayk8644는 RBI로부터 구입하였다. Nimodipine의 경우 DMSO(dimethyl sulfroxide)의 효과를 최소화하기 위하여 DMSO의 최종농도가 0.1 %를 넘지 않게 사용하였다.

2.6. 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 이하일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

제3장 결 과

3.1 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 효과

NCX만 특이하게 봉쇄하는 봉쇄제는 현재까지 알려져 있지 않고 또한 사용되고 있는 NCX 봉쇄제는 일부 L-type Ca^{2+} 전류를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Reuter 등, 2002). 그러므로 본 실험에서는 약물용액에 NCX의 기질 이온인 Na^+ 을 배제한(0Na) 용액을 사용함으로써 NCX를 봉쇄하였다. Ca^{2+} 외에 K^+ , Na^+ 그리고 Cl^- 이온의 간섭을 배제하기 위해 약물 용액은 K^+ 을 배제하였고 3 μM TTX와 0.1 mM DIDS를 첨가하였다. L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량은 탈분극 자극으로 발생한 L-type Ca^{2+} 전류에서 10 μM nimodipine에 의해 억제된 전류를 적분하여 측정하였고 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도는 최대 피크 전류의 90%에서 10%까지 감소할 때 걸리는 시간으로 측정하였다.

그림 1은 흰쥐 심실근세포에서 투석용액에 BAPTA가 존재하지 않을 때와 존재할 때 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 영향을 보여주고 있다. 그림 1A에서 보듯이 BAPTA가 존재하지 않을 때 탈분극 자극은 10 μM nimodipine에 의해 억제되는 내향 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient를 유발하였다. BAPTA가 존재하지 않을 때 0Na의 처치는 전하 유입량과 최대 피크 전류를 각각 $45.3 \pm 4.3\%$ (0.41 ± 0.03 에서 0.23 ± 0.03 pC/pF), $22.2 \pm 5.5\%$ (14.53 ± 0.8 에서 11.26 ± 0.9 pA/pF) 억제하였고 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도(0Na 처치 전; $\tau = 45.9 \pm 5.1$ ms, 0Na 처치 후; $\tau = 34.5 \pm 5.8$ ms)를 빨라지게 하였다. 그러나 0Na은 Ca^{2+} transient의 최대 피크 크기와 Ca^{2+} transient의 감소속도에 뚜렷한 변화를 유발하지 않았다. 한편 그림 1B에서 보듯이 10 mM BAPTA를 투석한 흰쥐 심실근세포는 세포내 Ca^{2+} transient를 완전히 사라지게 하였고 10 μM nimodipine으로 봉쇄되는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 두 배 이상 증가시켰으며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도($\tau = 136.7 \pm 15.0$ ms)를 느리게 하였다. 10mM BAPTA 투석 후 세포내 Ca^{2+} transient가 사라진다는 것은 BAPTA가 Ca^{2+} 의 확산을 제한하고 있음을 의미하고 이는 BAPTA 존재 하에서 Ca^{2+} 에 대한 반응이 세포 전체의 Ca^{2+} 반

응이 아닌 Ca^{2+} micro-domain 안에서 일어나는 반응임을 의미한다(Rousset 등 2004; You 등 1997; Tsien, 1980). BAPTA 존재 하에서 0Na 은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량과 최대 피크 전류를 각각 $17.6\pm 1.7\%$ (1.07 ± 0.14 에서 0.88 ± 0.11 pC/pF)와 $7.0\pm 1.6\%$ (16.34 ± 0.7 에서 15.17 ± 0.59 pA/pF) 억제하였고 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도($\tau=105.8\pm 7.1$ ms)를 빠르게 하였다.

이와 같은 결과는 흰쥐 심실근 세포에서 0Na 이 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 빠르게 하면서 L-type Ca^{2+} 전류를 억제하고 있음을 의미하고 또한 0Na 에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제가 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적 Ca^{2+} micro-domain 안에서 일어나고 있음을 의미한다 할 수 있을 것이다.

본 실험에서 0Na 처치에 의한 NCX 봉쇄는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 의 배출과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 의 배출을 모두 억제하게 될 것이다. Ca^{2+} 배출의 억제는 결국 L-type Ca^{2+} 통로 주위의 Ca^{2+} 농도를 증가시켜 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 빠르게 하며 L-type Ca^{2+} 전류를 억제하였을 것이다. 또한 0Na 처치에 의한 NCX의 봉쇄는 NCX가 Ca^{2+} 을 배출하면서 발생하는 내향 NCX 전류를 봉쇄 하였을 것이다. 결국 0Na 에 의해 억제되는 전류에는 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제와 내향 NCX 전류의 억제가 포함되어 있을 것이다. 그러므로 이어지는 실험에서는 0Na 으로 억제되는 전류에서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화 부분과 내향 NCX 전류를 구분하고자 하였다.

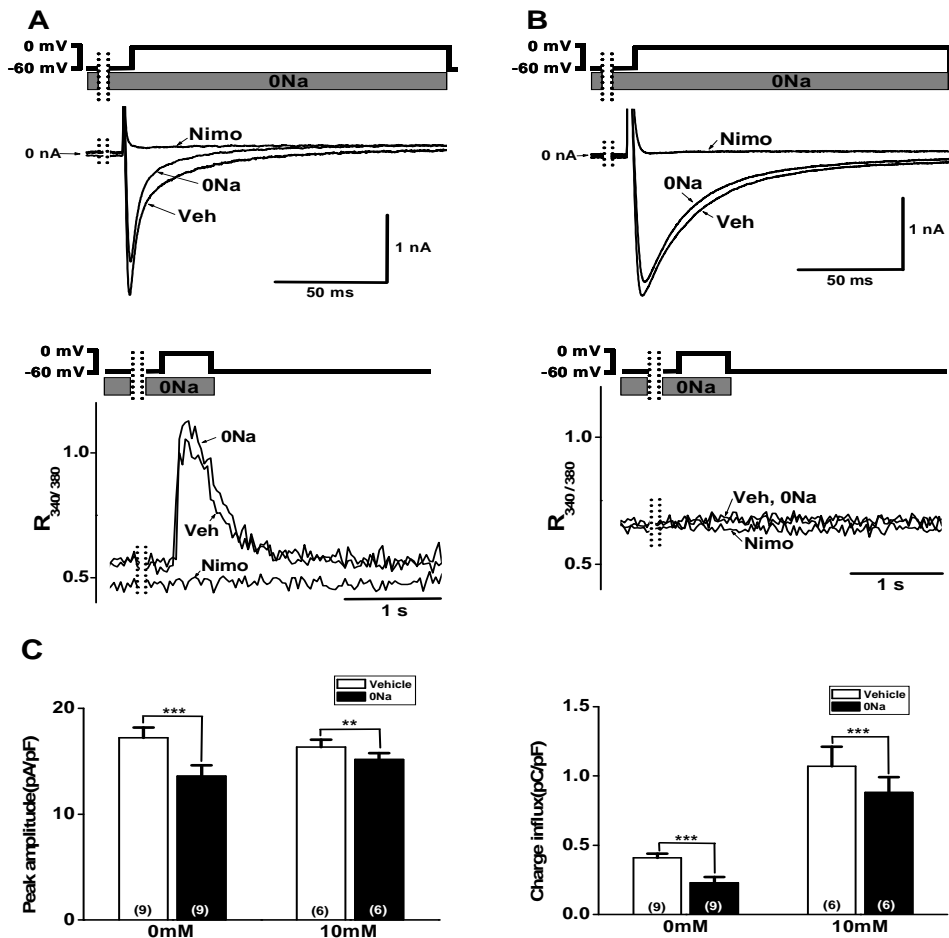


그림 1. 흰쥐 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제. 흰쥐 심실근세포에서 L-type Ca^{2+} 전류는 막전압을 -60 mV로 고정된 상태에서 0 mV로 200 ms 동안 탈분극 자극으로 유발하였고 $0Na$ 은 자극 5초 전부터 탈분극 자극이 끝날 때 까지 처치였다. BAPTA의 처치는 10 mM BAPTA를 투석용액에 첨가하여 세포내로 투석함으로써 수행하였다. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 피크 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. Veh: KCl 제거 tyrode 용액 + 0.1 mM DIDS + 3 μ M TTX, $0Na$: Veh에서 NaCl을 LiCl로 대체한 용액, Nimo: 10 μ M nimodipine. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

3.2 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 CDI 제거 후 0Na 의 효과

흰쥐의 심근에서 근소포체의 유리 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 65~75% 관여하는 것으로 알려져 있고 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 의 92%를 제공하고 있는 것으로 알려져 있기 때문에 그림 2에서는 근소포체의 Ca^{2+} 유리를 봉쇄하기 위해 100 μM ryanodine을 처치하였다. 그림 2A에서 보듯이 예상대로 BAPTA가 존재하지 않을 때 ryanodine의 처치는 세포내 Ca^{2+} transient를 상당히 억제하였고 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 $62.0 \pm 22.4\%$ (0.66 ± 0.13 에서 0.99 ± 0.14 pC/pF) 증가시켰으며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도($\tau = 113.7 \pm 4.7$ ms)를 느리게 하였다. 하지만 ryanodine 처치 후에 최대 피크 전류는 변화되지 않았다. Ryanodine 처치 후 0Na 의 처치는 최대 피크 전류보다 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 빠르게 하며 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 강하게 억제하였다. 0Na 의 처치는 전하 유입량을 $48.8 \pm 7.7\%$ (0.99 ± 0.14 에서 0.50 ± 0.10 pC/pF) 억제하면서 ryanodine 처치 전처럼 불활성 속도($\tau = 49.7 \pm 3.8$ ms)를 빠르게 하였다. 그렇지만 최대 피크 전류의 억제는 전하 유입량의 억제에 비해 억제 정도가 크지 않았으며 또한 세포내 Ca^{2+} transient는 0Na 에 의해 영향을 받지 않았다.

그림 2B에서 보듯이 유사한 반응은 또한 10 mM BAPTA로 투석하여 세포내 Ca^{2+} transient가 완전히 사라진 후에도 일어났다. 10 mM BAPTA의 투석으로 이미 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도가 느려진 심실근세포는 ryanodine 처치에 의해 전하 유입량이 증가하였고 불활성 속도를 더욱 느리게 하였다. BAPTA 존재하에서 ryanodine 처치 후 0Na 은 전하 유입량을 $14.6 \pm 1.8\%$ (1.78 ± 0.06 에서 1.52 ± 0.08 pC/pF) 억제하였고 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 다시 빠르게 하였다. 그렇지만 최대 피크 전류는 ryanodine 처치와 0Na 처치에 의해 크게 변화되지 않았다.

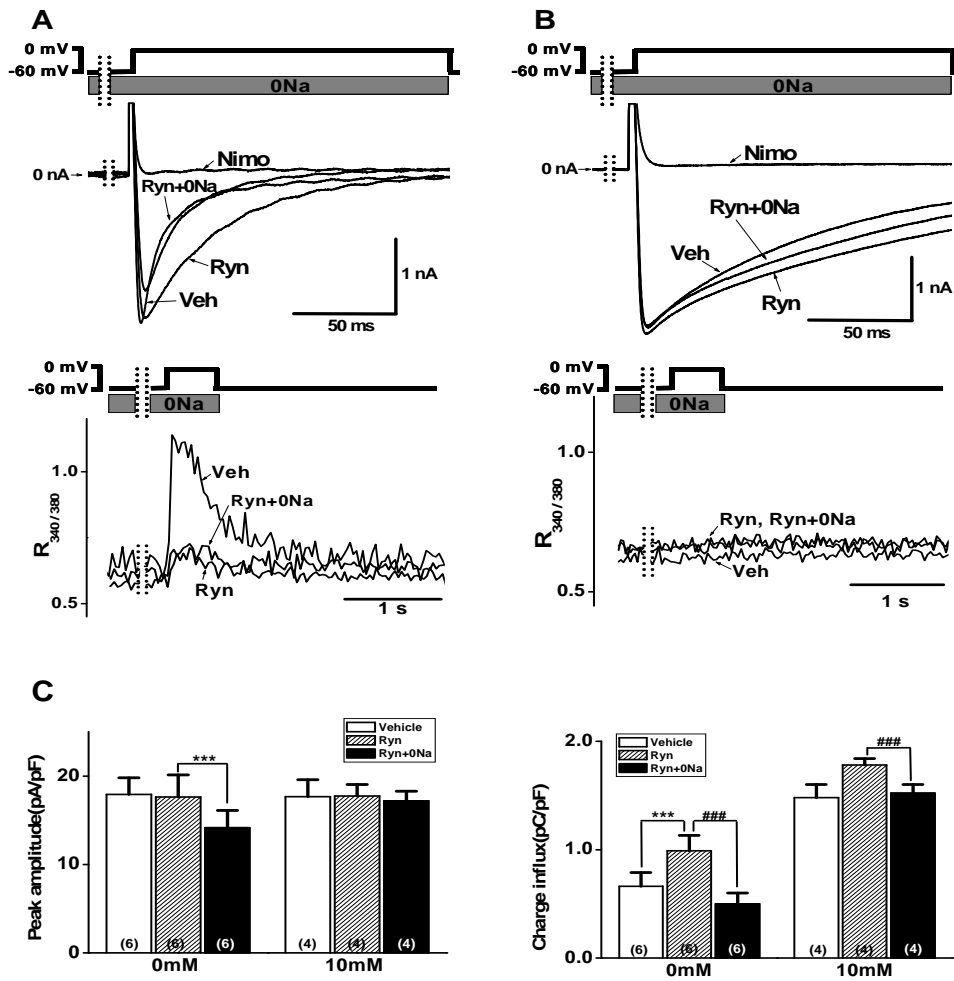


그림 2. 흰쥐 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 붕쇄가 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향. 100 μM ryanodine의 처치는 L-type Ca^{2+} 전류를 증가시켰고 0Na은 ryanodine 처치로 증가하는 전류가 평형상태에 도달할 때까지 기다린 후(약3분) 처치하였음. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험예수. Ryn: 100 μM ryanodine. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

3.3 BayK 8644와 isoproterenol의 CDI 제거 효과

비록 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 65%~75% 관여한다 할지라도 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 은 또한 남아있는 25~35%의 CDI에 관여하고 있다. 그러므로 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 이 0Na으로 억제되는 전류에 미치는 영향을 확인하기 위해 L-type Ca^{2+} 통로의 효현제인 BayK 8644와 isoproterenol의 효과를 비교하였다. BayK 8644는 isoproterenol과 달리 L-type Ca^{2+} 통로가 cAMP-의존적 단백질 키나아제(PKA)에 의해 인산화되어 있을 때 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 특히 의미 있게 느리게 하기 때문에 본 연구에서는 BayK 8644와 isoproterenol을 선택하였다 (Tiaho 등 1990; Adachi-Akahane 등, 1999). 그림 3은 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성에 대한 두 약물의 다른 영향을 보여 주고 있다. BAPTA가 존재하지 않는 흰쥐 심실근세포에서 3 μM BayK 8644와 2 μM isoproterenol은 모두 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 크게 증가 시켰으며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도(BayK 8644; $\tau=144.5\pm 11.1$ ms, isoproterenol; $\tau=121.3\pm 8.7$ ms)를 느리게 하였다. 하지만 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량에 있어 BayK 8644는 isoproterenol보다 훨씬 크게 증가 시켰다(BayK 8644; $158.8\pm 27.69\%$ 대 isoproterenol; $41.26\pm 6.79\%$). 한편 isoproterenol 처치 후 ryanodine의 처치는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 $32.0\pm 8.4\%$ 로 증가 시키며 isoproterenol에 의해 느려진 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 더욱 느리게 하였다. 반면에 BayK 8644의 경우 ryanodine 처치는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 증가시키지도 않았고 또한 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 느리게 하지 않았다. 이러한 결과는 BayK 8644의 경우 isoproterenol과는 달리 L-type Ca^{2+} 통로의 불활성 속도를 느리게 한다는 사실을 재확인하는 것이다.

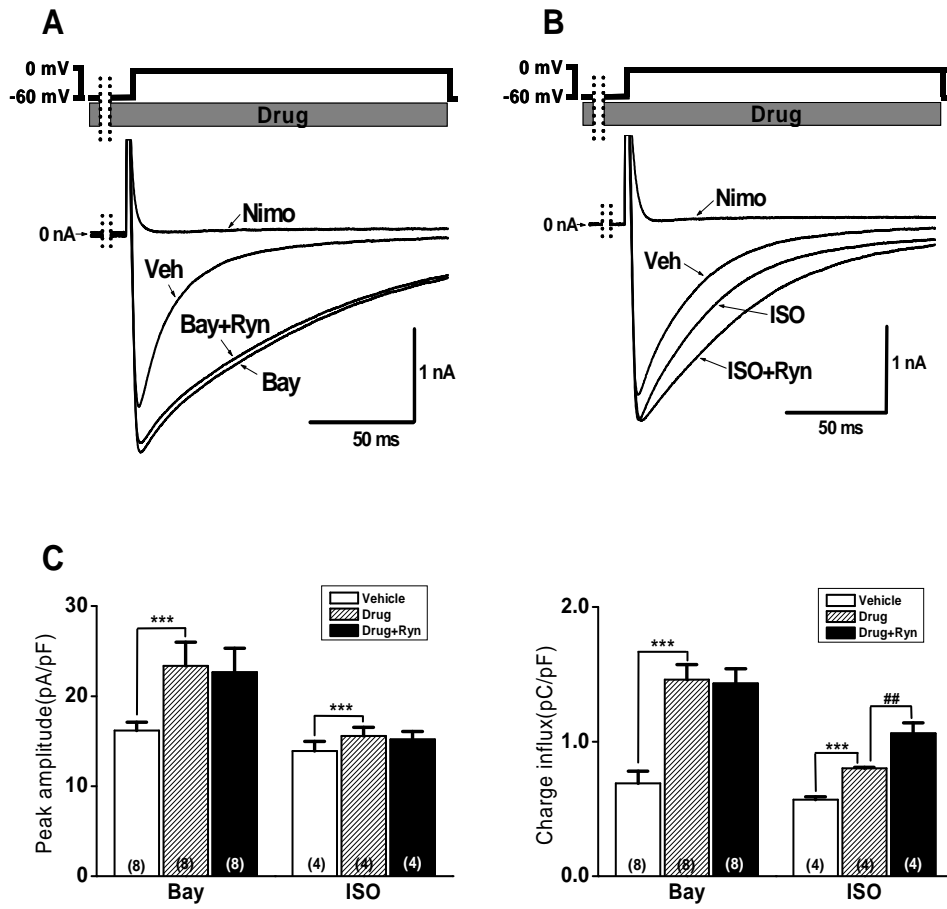


그림 3. 흰쥐 심실근세포에서 L-type Ca^{2+} 전류의 Ca^{2+} 의존적 불활성에 대한 BayK 8644와 isoproterenol의 비교. 3 μ M BayK 8644(A) 혹은 2 μ M isoproterenol(B) 처리 후 실제 L-type Ca^{2+} 전류. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. Bay: 3 μ M BayK 8644, ISO: 3 μ M isoproterenol. ***: $p < 0.001$, **, #: $p < 0.05$.

3.4 BayK 8644와 isoproterenol 처치 후 0Na의 효과

BayK 8644, isoproterenol 단독 또는 ryanodine를 조합하여 전처치한 후 0Na의 처치는 심실근세포의 강한 수축을 유발하였으며 이 후 세포가 죽는 결과를 발생하였다. 그러므로 이러한 강한 수축을 방지하고 세포를 보호하기 위해 BayK 8644 혹은 isoproterenol를 처치하기 전에 100 μ M ryanodine를 투석용액에 첨가하여 세포내로 투석하였다. 100 μ M ryanodine를 투석한 세포는 평형상태에 도달하기 위해 10분 이상 기다렸고 이후 실험을 실시하였다. BAPTA가 존재하지 않는 심실근세포에서 ryanodine의 세포내 투석은 근소포체 유리 Ca^{2+} 의 봉쇄에 기인하여 세포내 Ca^{2+} transient를 크게 감소시켰다. Ryanodine을 투석한 흰쥐 심실근세포에서 BayK 8644 혹은 isoproterenol의 처치는 전하유입량을 유사한 크기로 증가시키며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 느리게 하였다. 그림 5에서 보듯이 BayK 8644 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류는 그림 2에서 ryanodine 단독 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류와 비교하여 BAPTA가 존재하지 않는 경우에는 감소하였고 BAPTA가 존재할 경우에는 오히려 증가하였다. BAPTA가 존재하지 않은 경우 0Na으로 억제되는 전하 유입량은 $34.0 \pm 1.7\%$ (1.58 ± 0.09 에서 1.03 ± 0.05 pC/pF)로 ryanodine 단독 처치에 억제되는 $48.8 \pm 7.7\%$ 보다 억제 비율이 감소하였고 BAPTA가 존재하는 경우 0Na로 억제되는 전하 유입량은 $21.9 \pm 4.2\%$ (1.88 ± 0.08 에서 1.48 ± 0.15 pC/pF)로 ryanodine 단독 처치에 억제되는 $14.6 \pm 1.8\%$ 보다 억제 비율이 증가하였다. 이와 대조적으로 그림 4에서 보듯이 2 μ M isoproterenol 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량은 ryanodine 단독 처치 군과 비교하여 BAPTA가 존재하지 않은 경우 $47.6 \pm 6.9\%$ (1.42 ± 0.06 에서 0.75 ± 0.10 pC/pF) 그리고 BAPTA가 존재할 경우 $18.3 \pm 3.1\%$ (2.60 ± 0.10 에서 2.13 ± 0.11 pC/pF)로 별 차이를 보이지 않았다.

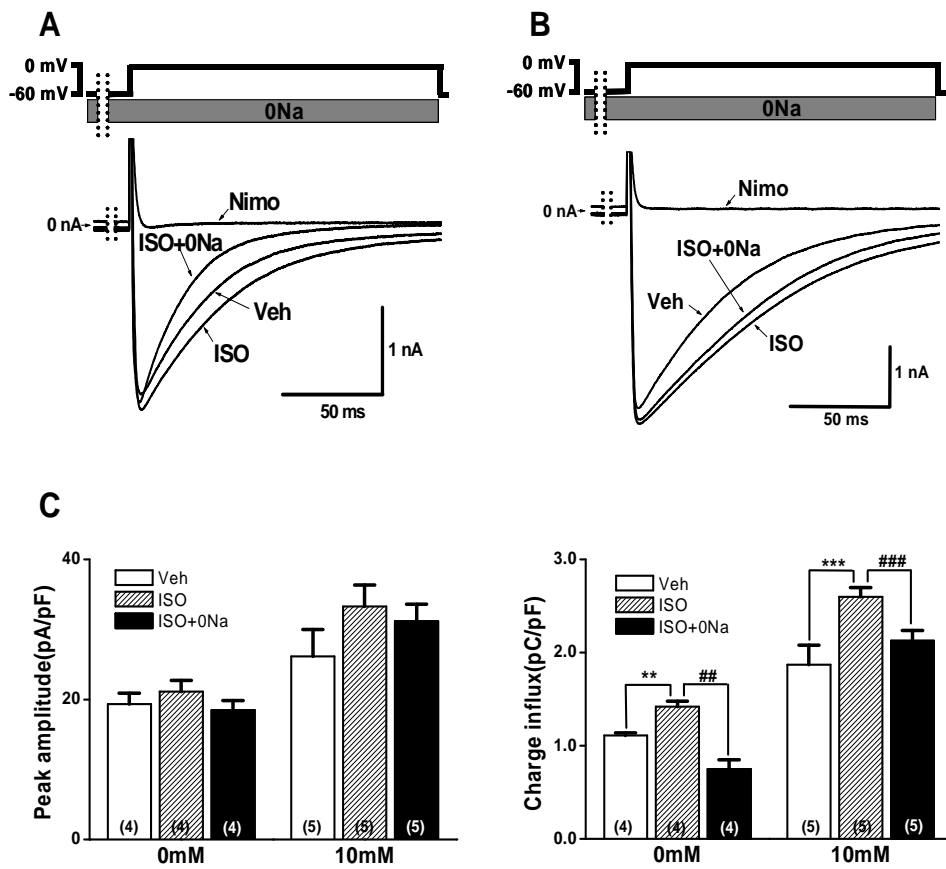


그림 4. Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 흰쥐 심실근세포에서 isoproterenol에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화. Ryanodine 및 BAPTA는 pipette내에 첨가하였음. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***, ###: $p < 0.001$, **, #: $p < 0.05$.

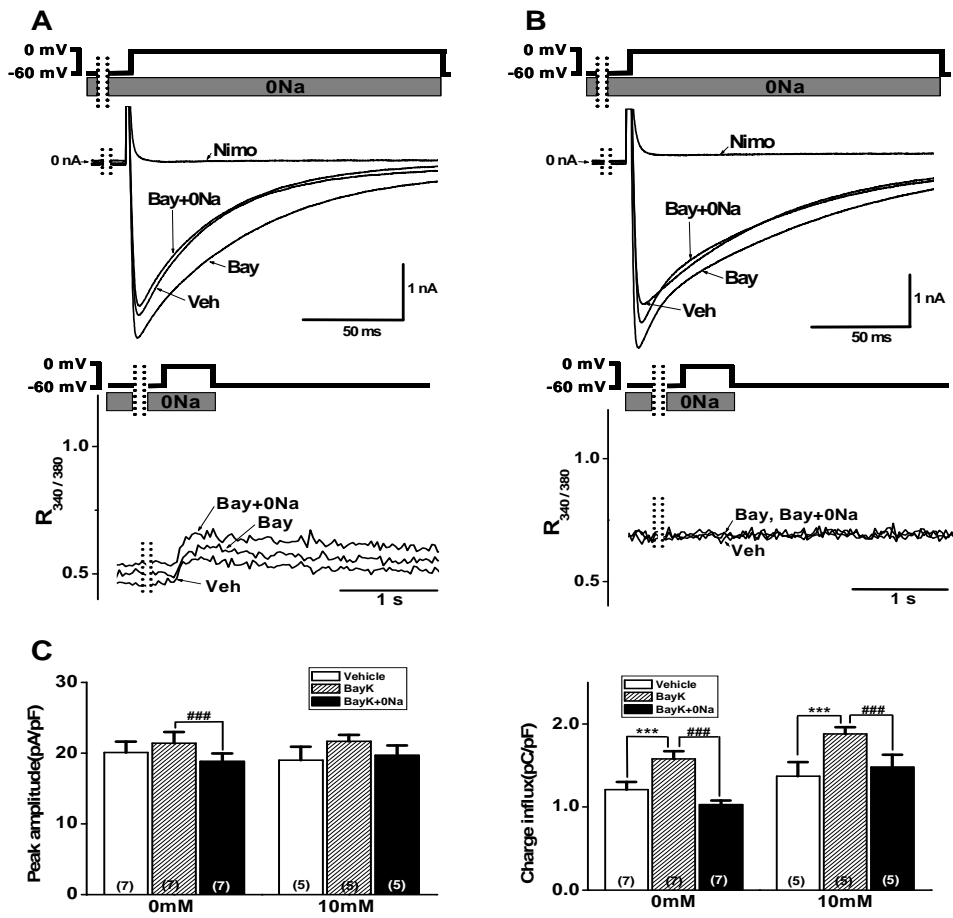


그림 5. Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 흰쥐 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화. Ryanodine 및 BAPTA는 pipette내에 첨가하였음. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***, ###: $p < 0.001$.

3.5 0Na으로 억제된 Ca^{2+} 전류의 탈분극 시간에 따른 변화

그림 6은 흰쥐 심실근세포에서 각 처치군간 실제 0Na에 의해 봉쇄된 내향 전류의 시간에 따른 변화를 보여 주고 있다. L-type Ca^{2+} 전류에서 0Na에 봉쇄된 내향전류는 그림 1, 2, 4, 5에서 0Na의 처치 전과 처치 후의 L-type Ca^{2+} 전류의 차를 가지고 계산하였다. 왼쪽 그림은 실제 0Na으로 억제된 전류를 보여주고 있고 오른쪽 그림은 0Na 처치 전 최대 피크 전류에 대한 % 비율로 표시하였다. 그림 6A에서 보듯이 BAPTA가 존재하지 않을 경우 실제 0Na에 봉쇄된 내향 전류는 10 ms 이전에 피크 값에 도달한 후 점진적 감소를 보였다. 그렇지만 ryanodine를 단독 처치한 군에서는 첫 번째 피크 외에 새로이 두 번째 피크를 발생하였다(그림 6B). Ryanodine에 의해 발생한 두 번째 피크는 자극이 개시된 후 20.6 ± 0.1 ms에서 첫 번째 피크 값보다 더 큰 피크 값에 도달하였고 자극이 종료될 때까지 지속되었다. 이러한 두 번째 피크는 BayK 8644에 의해 오히려 억제되었고 최대 피크에 도달하는 시간을 오른쪽으로 이동시켰다(그림 6D). 하지만 isoproterenol은 ryanodine에 의해 발생한 두 번째 피크를 더욱 크게 증가시켰다(그림 6C). 한편 첫 번째 피크는 10 mM BAPTA를 투석한 후에도 모든 약물 처치 군에서 잘 보존되어 있었다. 반면 BAPTA가 존재하지 않을 때 ryanodine과 isoproterenol에 의해 발생하고 증가한 두 번째 피크는 10mM BAPTA에 의해 대부분 억제되었다. 그렇지만 BAPTA가 존재할 때 BayK 8644의 처치는 BAPTA에 의해 억제되는 두 번째 피크를 증가시켰다. 이와 같은 결과로부터 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류는 BAPTA로 억제되는 전류와 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류로 구분할 수 있다. 한편 BayK 8644 처치군의 결과는 BayK 8644가 BAPTA에 억제되는 전류를 감소시켰고 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류를 증가시켰다. 결과적으로 그림 6E에 보듯이 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류의 비율은 BayK8644의 처치 후에 38.6%에서 64.2%로 증가하였다.

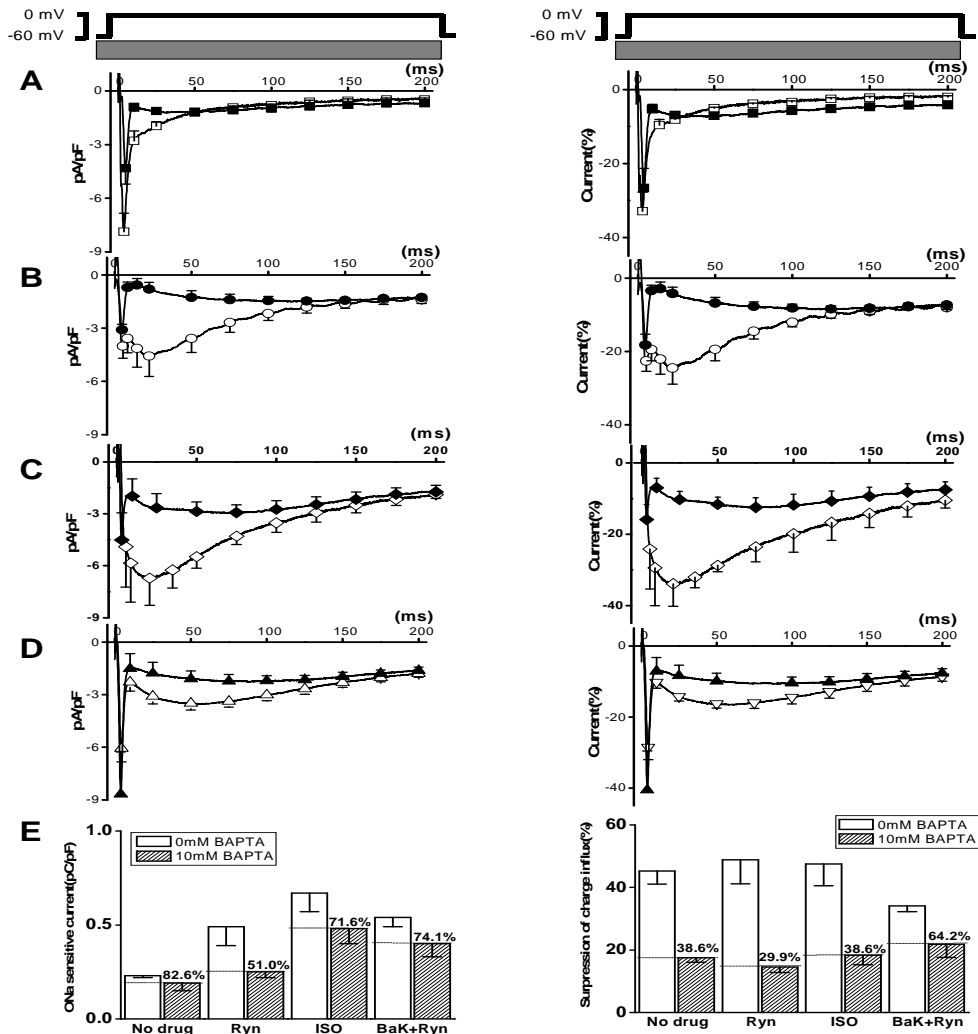


그림 6. 흰쥐 심실근세포에서 0Na으로 억제된 실제 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화. 0Na으로 억제된 실제 전류는 그림 1(A), 그림 2(B), 그림 4(C), 그림 5(D)에서 0Na 처치 전후의 I_{CaL} 의 차이로 산출하였으며 좌측 panel은 실제 전류, 우측 panel은 I_{CaL} 의 최대 전류에 대한 %로 표시하였음. E: A~D의 각 전류의 전하 유입량으로 좌측 panel은 실제값, 우측 panel은 I_{CaL} 전하 유입량에 대한 %로 표시하였음. □, ○, ◇, △: 0mM BAPTA, ■, ●, ◆, ▲: 10mM BAPTA, □, ■: 대조군, ○, ●: 100 μ M ryanodine, ◇, ◆: 3 μ M isoproterenol, △, ▲: 3 μ M BayK 8644.

3.6 0Na으로 억제되는 전류의 특성

그림 7에서는 0Na에 봉쇄되는 L-type Ca^{2+} 전류가 NCX에 의한 전류라는 것을 명확히 하기 위해 약물 용액에 Ca^{2+} 을 Ba^{2+} 으로 대체하여 비교하였다. Ba^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되면서 Ba^{2+} 전류를 발생하지만 근소포체로부터 Ca^{2+} 유리를 유발하지 않고 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 영향을 거의 미치지 않는다. 그리고 Ba^{2+} 은 NCX를 통해 배출되지 않는다(Trac 등, 1997). 그림 7에서 보듯이 예상대로 흰쥐 심실근세포에서 탈분극 자극에 의해 발생한 Ba^{2+} 전류는 L-type Ca^{2+} 전류에 비해 최대 피크 전류를 $10.3 \pm 5.5\%$ 증가시켰고 전하유입량은 $476.9 \pm 44.0\%$ 로 크게 증가시켰다. 또한 불활성 속도를 크게 감소시킴으로서 Ca^{2+} 에 의한 CDI 효과를 제거하였다. 하지만 이러한 Ba^{2+} 전류는 0Na으로 억제되지 않았다. 또한 ryanodine를 세포내 투석한 세포는 L-type Ca^{2+} 전류와 마찬가지로 BayK8644의 처치에 의해 Ba^{2+} 전류의 최대 피크 전류를 $6.2 \pm 7.5\%$ 증가시켰고 전하 유입량을 $136.5 \pm 24.9\%$ 로 증가시켰다. 이렇게 증가한 Ba^{2+} 전류 역시 0Na으로 억제되지 않았다.

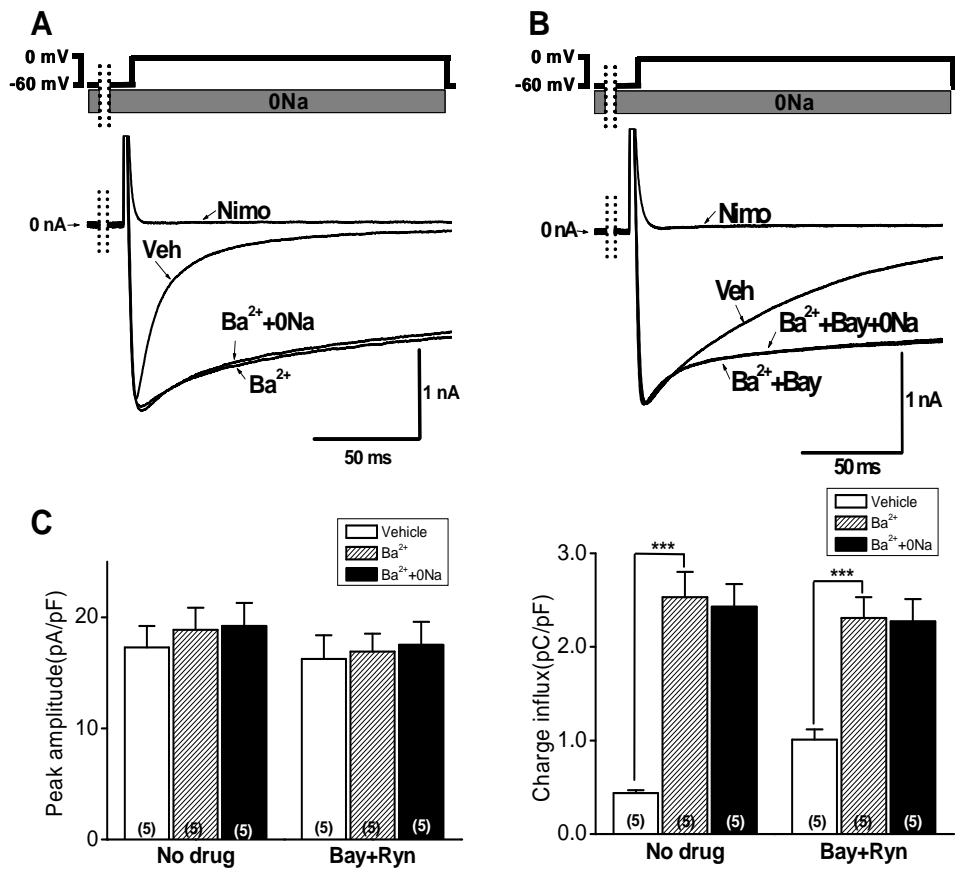


그림 7. Ca²⁺을 Ba²⁺으로 치환시 Na⁺ 배제가 미치는 영향. Ryanodine 및 BayK 8644 전처치 전(A)과 후(B)의 실제 전류의 변동과 이때의 전하 유입량(C). ()안의 숫자는 실험 예수. ***: p < 0.001.

3.7 토끼와 기넌픽에서 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 영향

흰쥐의 심실근세포에서 0Na으로 봉쇄되는 전류는 BAPTA에 의해 억제되는 전류와 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류로 구분되었다. 이러한 실험을 E-C coupling 과정에서 NCX의 활성이 다른 토끼와 기넌픽에서 반복하여 수행하였다. 흰쥐와 마찬가지로 10 mM BAPTA는 토끼와 기넌픽에서도 세포내 Ca^{2+} transient를 완전히 사라지게 하였다. 또한 약물을 전처리 하지 않은 군에서 BAPTA가 존재하지 않을 때와 BAPTA가 존재할 때 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하유입량을 억제하며 불활성 속도를 빠르게 하였고 세포내 Ca^{2+} transient의 최대 피크 크기와 감소속도를 변화시키지 않았다(그림 8과 12). 그리고 흰쥐와 마찬가지로 BayK 8644의 처치는 근소포체의 유리 Ca^{2+} 에 의한 CDI를 사라지게 하였다(그림 16).

그림 9와 13은 토끼와 기넌픽에서 ryanodine 처치로 근소포체의 Ca^{2+} 유리를 봉쇄한 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류를 보여주고 있다. 흰쥐 심실근세포와 마찬가지로 BAPTA가 존재하지 않을 때 ryanodine 처치는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하유입량을 토끼와 기넌픽에서 각각 $61.1 \pm 10.5\%$ (0.44 ± 0.22 에서 0.75 ± 0.77 pC/pF), $91.7 \pm 7.4\%$ (0.74 ± 0.05 에서 1.41 ± 0.1 pC/pF) 증가시켰고 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 느리게 하였다. Ryanodine 처치 후 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 토끼와 기넌픽에서 각각 $56.4 \pm 3.4\%$, $52.5 \pm 3.7\%$ 억제하면서 불활성 속도를 빠르게 하였다. 또한 10 mM BAPTA를 투석한 토끼와 기넌픽 심실근세포에서 ryanodine은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하유입량을 증가시키며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성을 느리게 하였고 BAPTA 존재 하에서 ryanodine 처치 후 0Na은 토끼와 기넌픽에서 전하 유입량을 각각 $17.5 \pm 3.4\%$, $17.2 \pm 1.4\%$ 씩 억제하며 불활성 속도를 빠르게 하였다. 하지만 BAPTA가 존재하지 않을 때 ryanodine은 기넌픽에서 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 92% 증가시켰다. 이러한 값은 흰쥐 62%, 토끼 61%와 비교하여 약 1.5배 증가한 값이다. 또한 BAPTA가 존재할 때 ryanodine은 토끼와 기넌픽에서 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 각각 46%, 9% 증가시켰다. 이러한 전하 유입량의 증가는 토끼에서 22% 증가한 값과 비교하여 토끼의 경우 2

배 증가하고 기넉픽의 경우 2배 감소한 값이다.

그림 10과 14는 토끼와 기넉픽에서 ryanodine과 BayK 8644 처치 후 L-type Ca^{2+} 전류에 대한 0Na의 영향을 보여주고 있다. 토끼와 기넉픽에서도 ryanodine의 세포내 투석은 세포내 Ca^{2+} transient를 크게 감소시켰고 BayK 8644의 처치는 두 종에서 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 유사한 크기로 증가시켰으며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 느리게 하였다. BayK 8644 처치 후 0Na은 전하 유입량을 토끼와 기넉픽에서 각각 $35.5 \pm 3.8\%$, $49.2 \pm 2.4\%$ 억제하였다. 또한 BAPTA 존재 하에서도 ryanodine 전처치 후 BayK 8644는 전하 유입량을 두 종에서 유사한 크기로 증가시켰으며 L-type Ca^{2+} 전류의 불활성 속도를 느리게 하였고 BAPTA 존재하에서 BayK 8644 처치 후 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 토끼와 기넉픽에서 각각 $11.1 \pm 1.4\%$ 와 $9.9 \pm 1.0\%$ 억제하였다. 하지만 BAPTA가 존재하지 않을 때 ryanodine과 BayK 8644 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류는 토끼의 경우 흰쥐와 마찬가지로 ryanodine 단독 처치 군보다 뚜렷하게 감소되는 경향을 보였지만 기넉픽의 경우 뚜렷한 감소를 보이지 않았다. 또한 BAPTA가 존재할 때 ryanodine과 BayK 8644 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류는 흰쥐와 달리 토끼와 기넉픽에서는 ryanodine 단독 처치 군보다 오히려 감소하는 경향을 보였다.

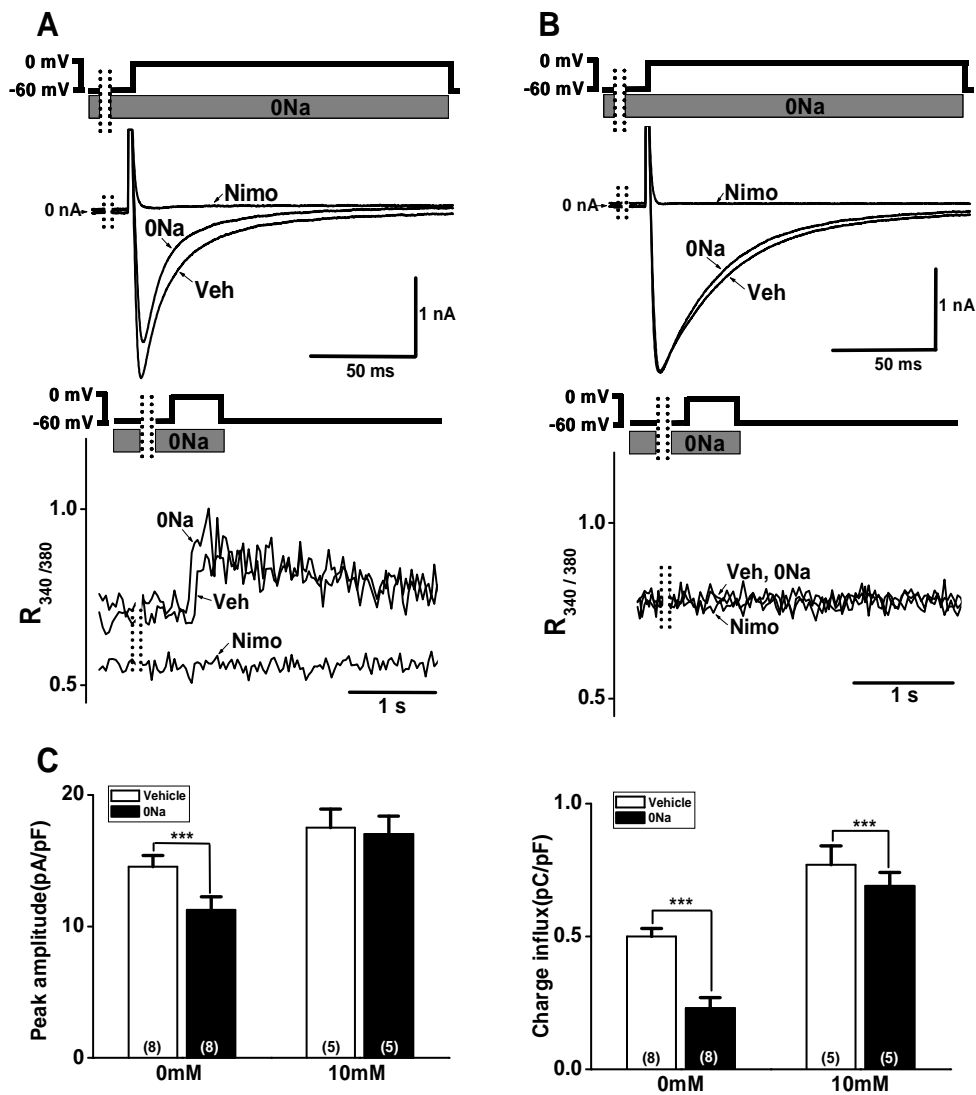


그림 8. 토끼 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제. 토끼 심실근세포에서 BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B) 나타나는 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***: $p < 0.001$.

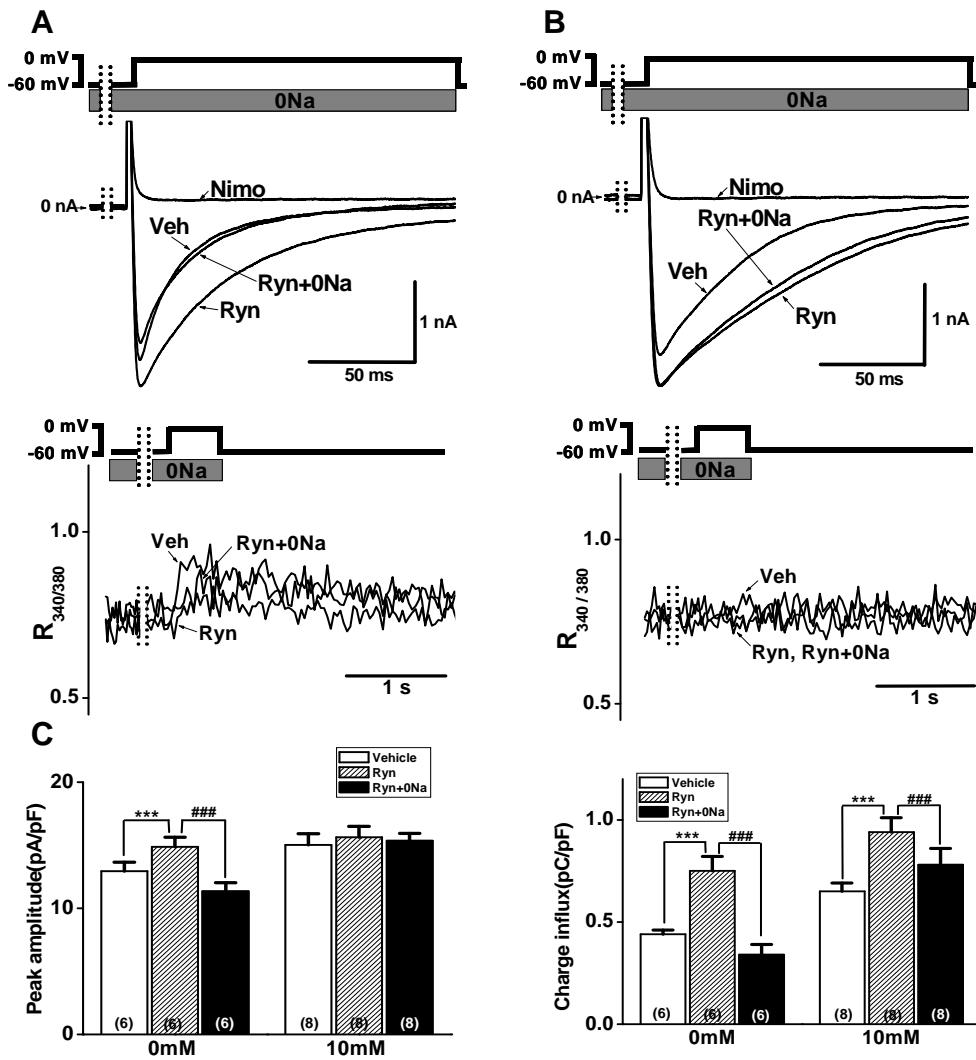


그림 9. 토끼 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 봉쇄가 Na^+ 배체에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향. 토끼 심실근세포에서 BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B) ryanodine 처리 후 나타나는 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***, ###: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

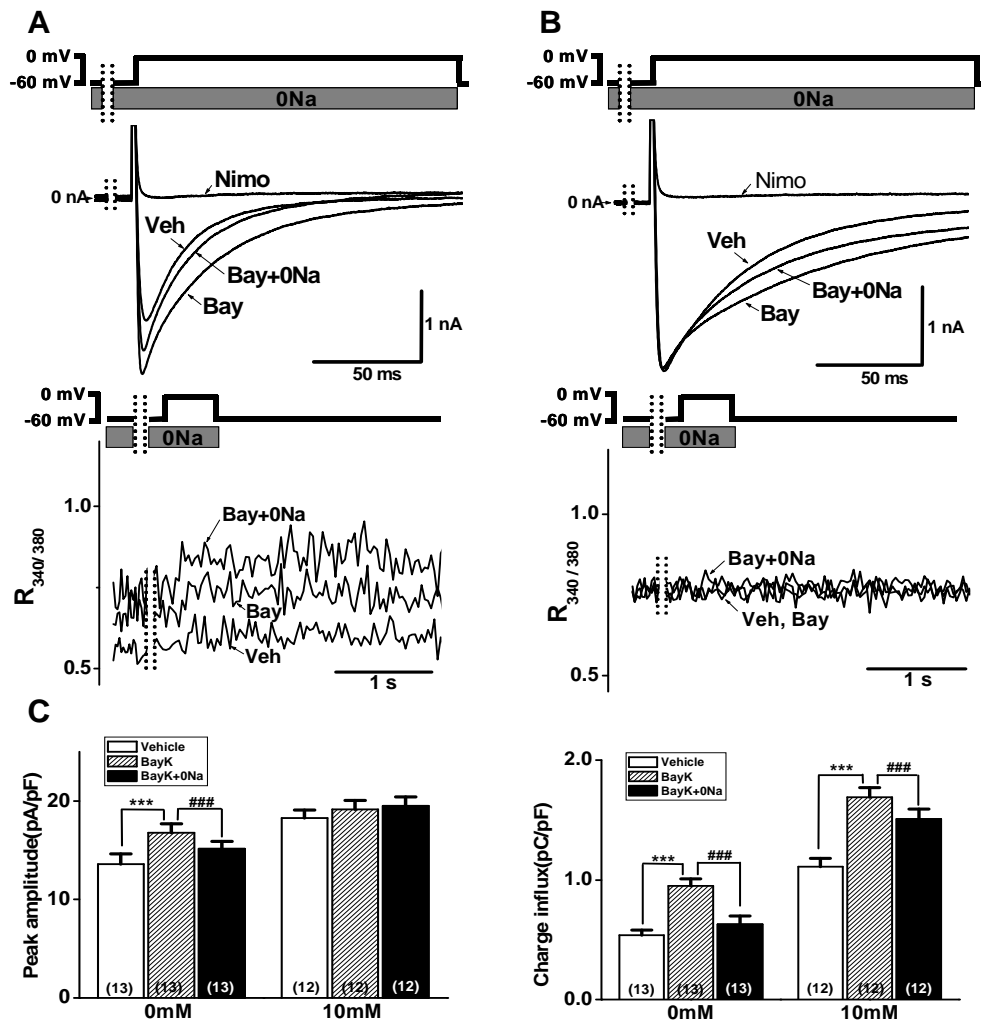


그림 10. Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 토끼 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화. Ryanodine 및 BAPTA는 pipette내에 첨가하였음. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***, ###: $p < 0.001$.

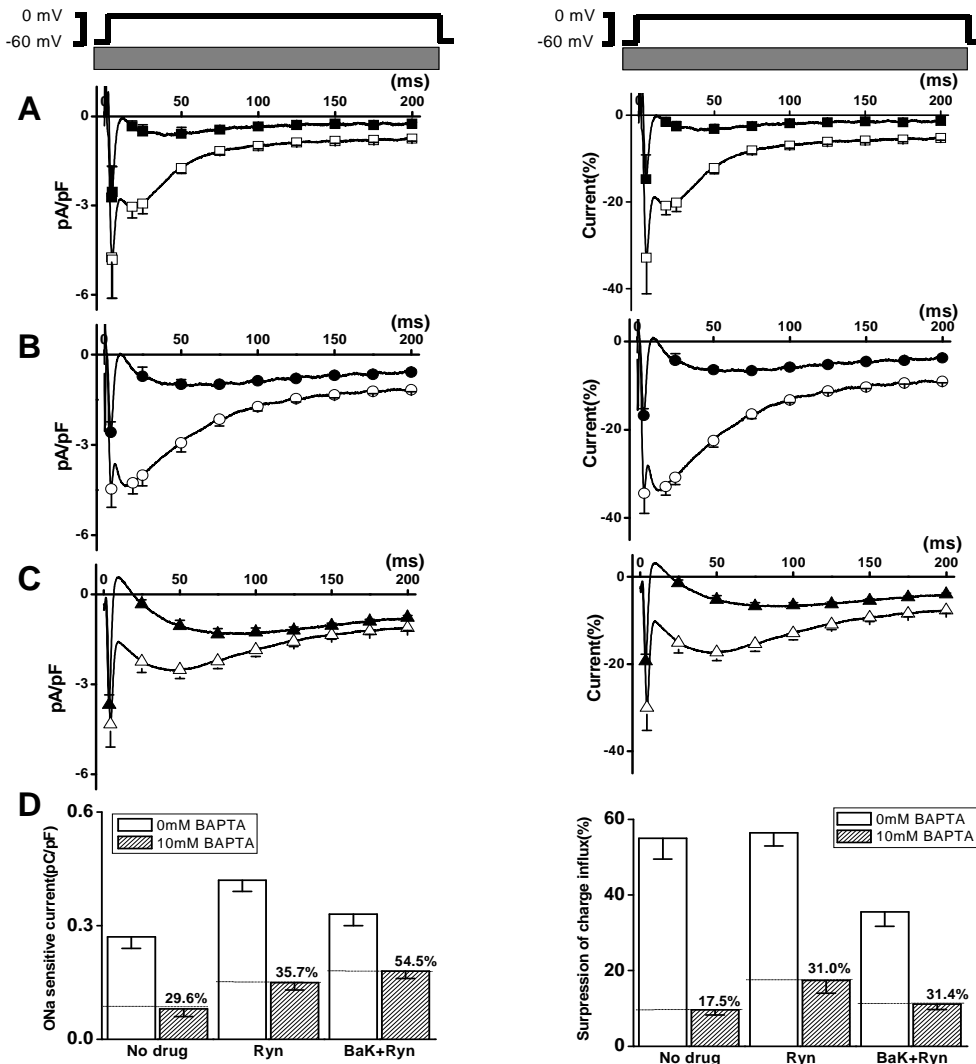


그림 11. 토끼 심실근세포에서 0Na으로 억제된 실제 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화. 0Na으로 억제된 실제 전류는 그림 8(A), 그림 9(B), 그림 10(C)에서 0Na 처치 전후의 I_{CaL} 의 차이로 산출하였으며 좌측 panel은 실제 전류, 우측 panel은 I_{CaL} 의 최대 전류에 대한 %로 표시하였음. D: A~C의 각 전류의 전하 유입량으로 좌측 panel은 실제값, 우측 panel은 I_{CaL} 전하 유입량에 대한 %로 표시하였음. □, ○, △: 0 mM BAPTA, ■, ●, ▲: 10 mM BAPTA, □, ■: 대조군, ○, ●: 100 μ M ryanodine, △, ▲: 3 μ M BayK 8644.

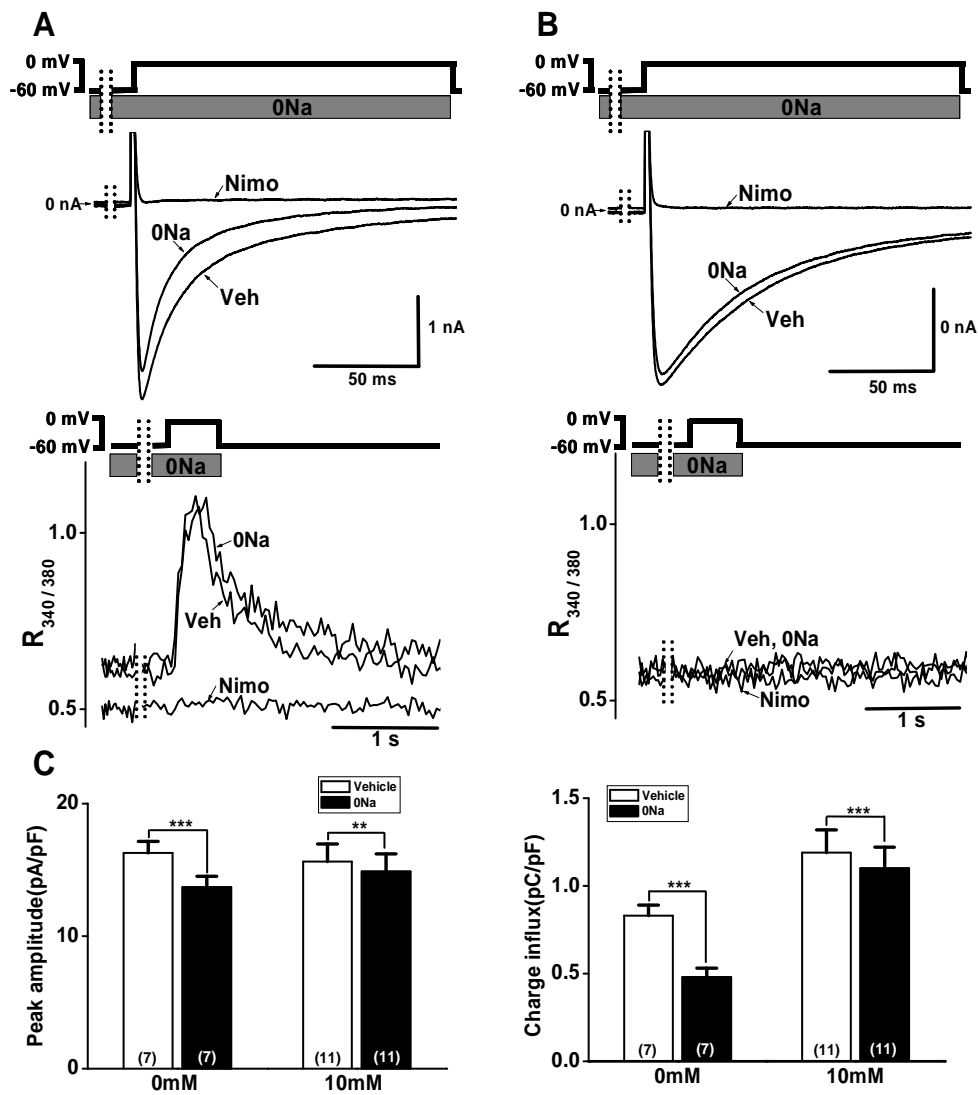


그림 12. 기네피크 심실근세포에서 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제. 기네피크 심실근세포에서 BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B) 나타나는 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

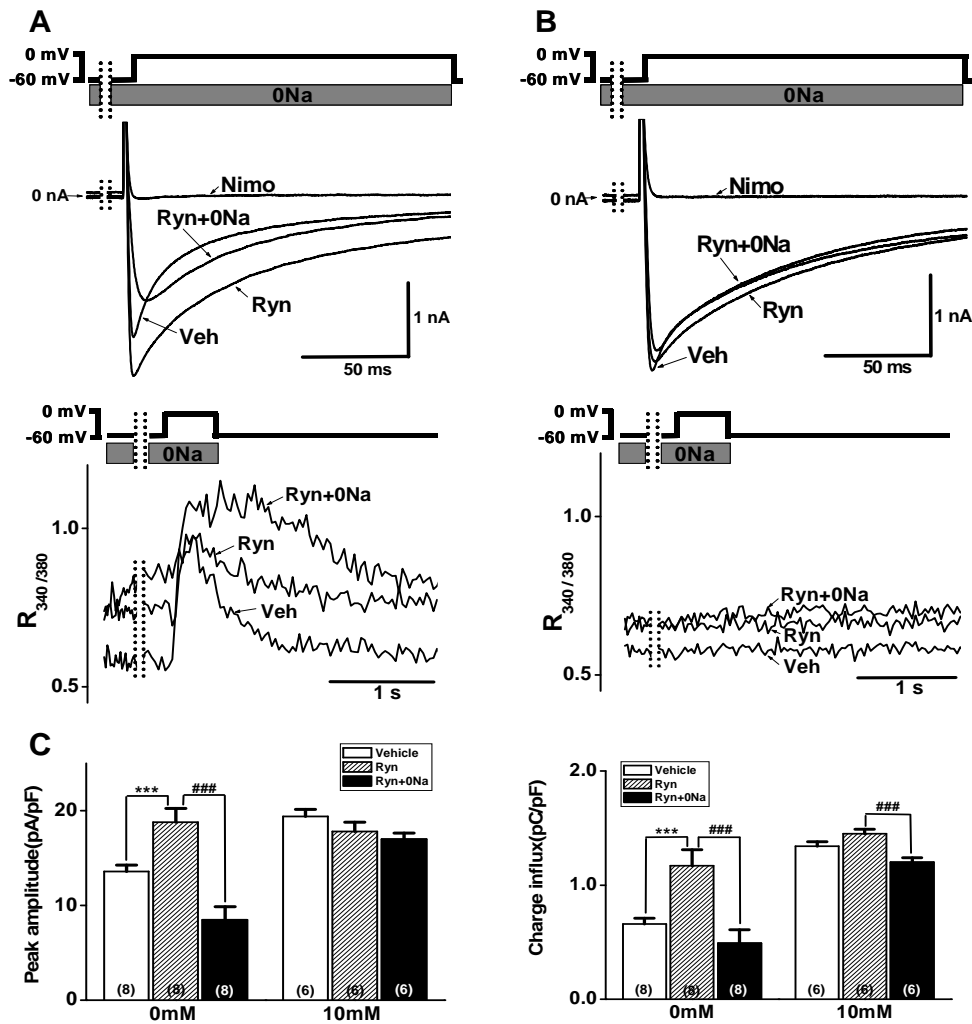


그림 13. 기넝픽 심실근세포에서 ryanodine에 의한 근소포체 Ca^{2+} 유리 붕쇄가 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류 억제에 미치는 영향. 기넝픽 심실근세포에서 BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B) ryanodine 처치 후 나타나는 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

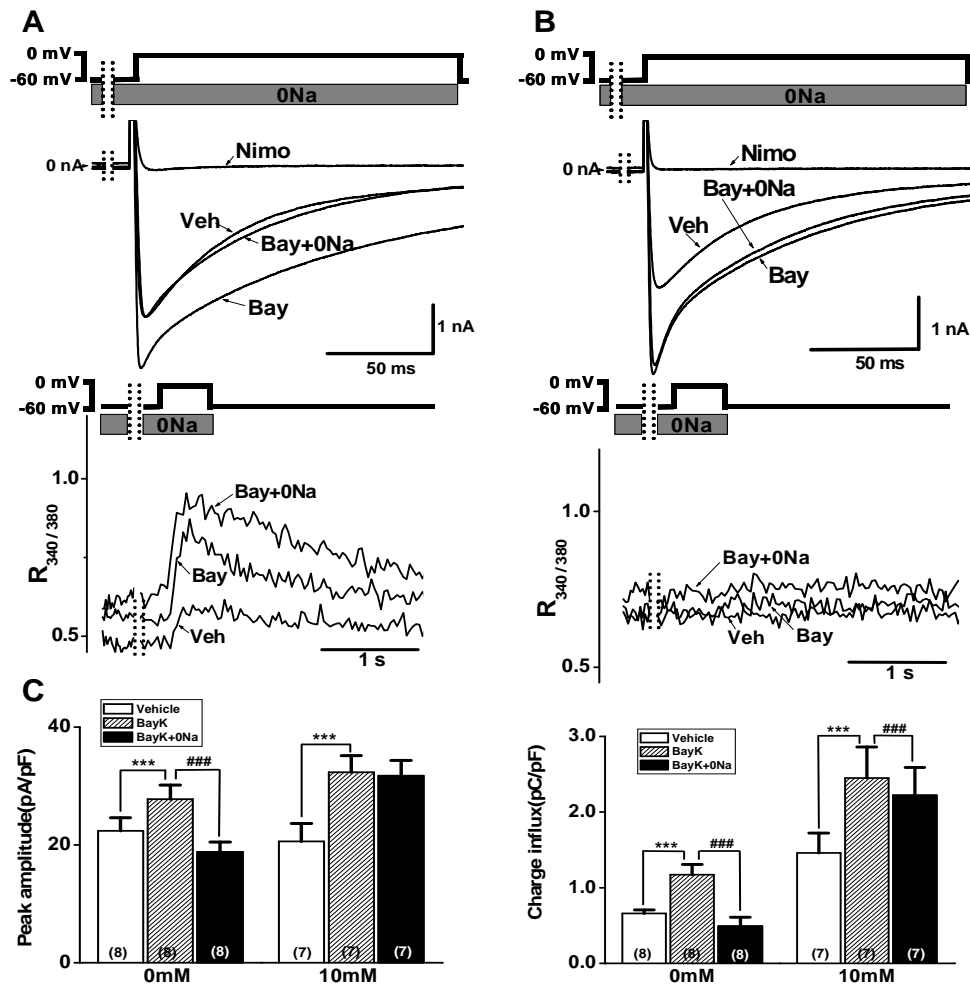


그림 14. Ryanodine으로 근소포체 Ca^{2+} 유리를 봉쇄시킨 기니픽 심실근세포에서 BayK 8644에 의한 Na^+ 배제에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제 완화. Ryanodine 및 BAPTA는 pipette내에 첨가하였음. BAPTA가 존재하지 않을 때(A) 혹은 10 mM BAPTA가 존재할 때(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량. ()안의 숫자는 실험 예수. ***, ###: $p < 0.001$.

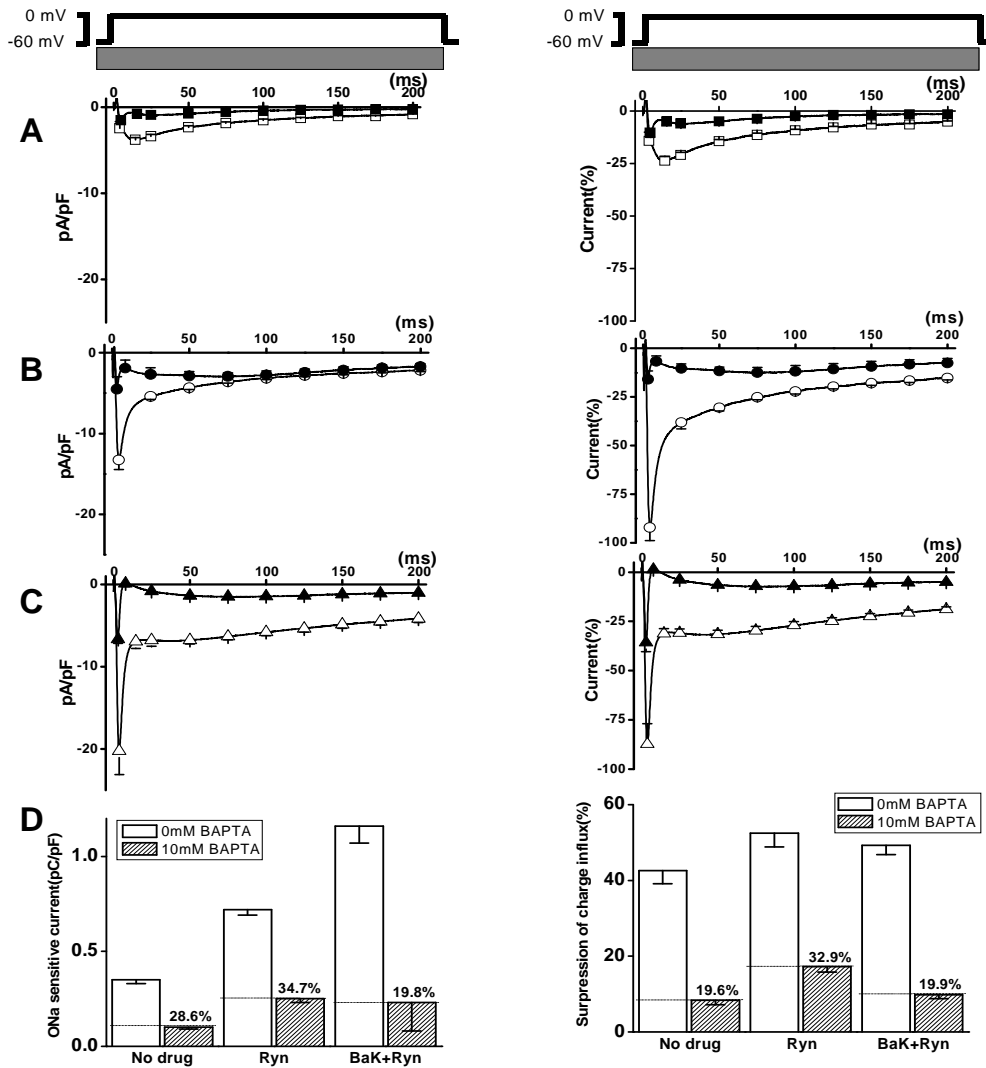


그림 15. 기너픽 심실근세포에서 0Na으로 억제된 전류의 탈분극 자극 시간에 따른 변화. 0Na으로 억제된 실제 전류는 그림 12(A), 그림 13(B), 그림 14(C)에서 0Na 처치 전후의 I_{CaL} 의 차이로 산출하였으며 좌측 panel은 실제 전류, 우측 panel은 I_{CaL} 의 최대 전류에 대한 %로 표시하였음. D: A~C의 각 전류의 전하 유입량으로 좌측 panel은 실제값, 우측 panel은 I_{CaL} 전하 유입량에 대한 %로 표시하였음. □, ○, △: 0 mM BAPTA, ■, ●, ▲: 10 mM BAPTA, □, ■: 대조군, ○, ●: 100 μ M ryanodine, △, ▲: 3 μ M BayK 8644.

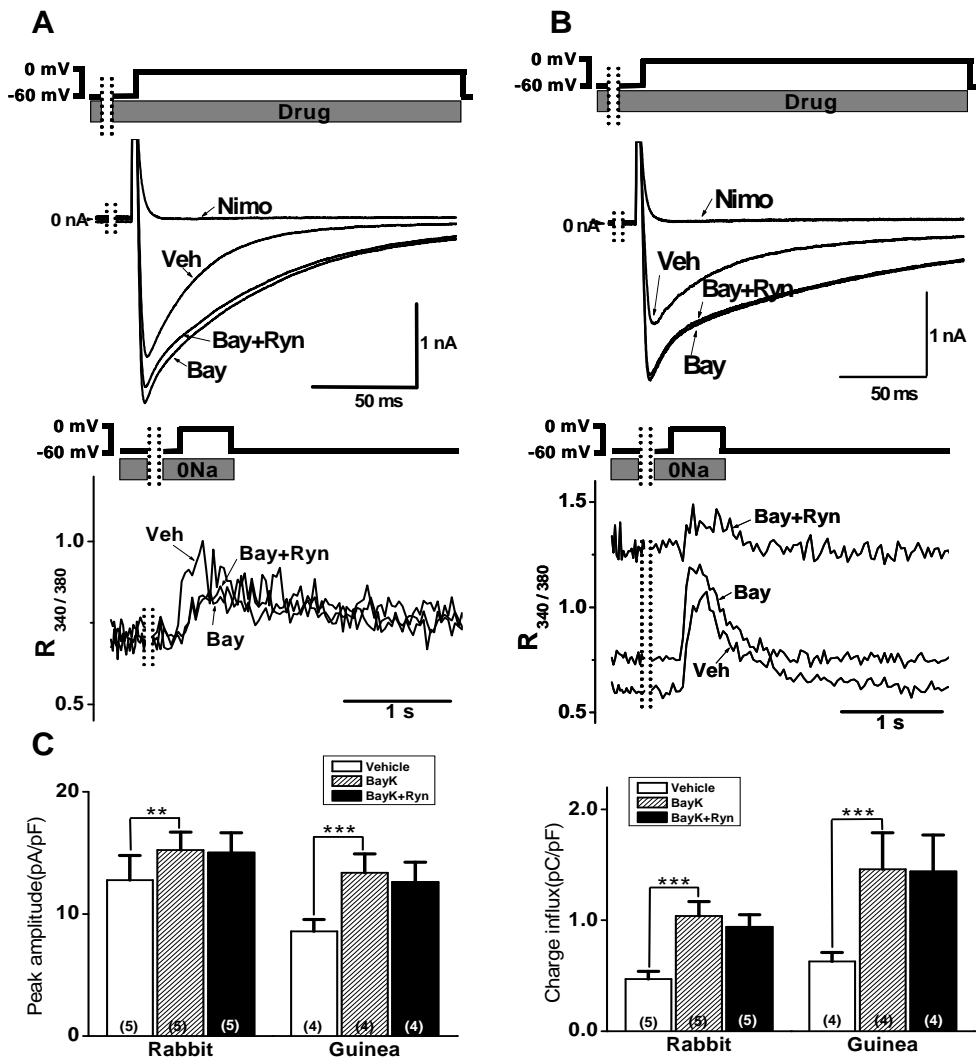


그림 16. 토끼와 기네피크 심실근세포에서 BayK 8644가 L-type Ca^{2+} 전류의 Ca^{2+} 의존적 불활성 완화 작용. 토끼(A)와 기네피크(B)의 실제 L-type Ca^{2+} 전류와 세포내 Ca^{2+} transient. C: L-type Ca^{2+} 최대 전류와 전하유입량(좌측: 토끼; 우측: 기네피크). ()안의 숫자는 실험 예수. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$.

3.8 토끼와 기넉픽의 심실근세포에서 0Na으로 억제되는 Ca^{2+} 전류의 탈분극 시간에 따른 변화

그림 11과 15는 토끼와 기넉픽 심실근세포에서 각 처치군간 실제 0Na에 의해 억제되는 전류의 시간에 따른 변화를 보여 주고 있다. BAPTA가 존재하지 않을 때 0Na에 의해 억제되는 전류는 흰쥐 심실근세포와 달리 첫 번째 피크와 두 번째 피크를 발생하였다. 0Na으로 억제되는 전류는 토끼에서 첫 번째 피크를 발생한 후 감소하다 다시 20 ms 근처에서 피크 값을 가지는 두 번째 피크를 발생하였고 기넉픽에서는 첫 번째 피크를 발생한 후 계속 증가하여 20 ms 근처에서 피크 값을 가지는 두 번째 피크를 발생하였다. Ryanodine은 토끼의 경우 첫 번째 피크의 증가 없이 두 번째 피크만 크게 증가 시켰고 반면에 기넉픽의 경우 첫 번째 피크와 두 번째 피크를 모두 증가시켜 두 피크 사이의 구분을 사라지게 하였다. 토끼에서 ryanodine에 의해 증가한 두 번째 피크는 흰쥐와 마찬가지로 BayK 8644에 의해 억제되었고 두 번째 피크에 도달하는 시간을 오른쪽으로 이동시켰다. 반면에 기넉픽에서 BayK8644는 ryanodine에 의해 증가한 피크의 폭을 좁게 하며 억제하였다. 10 mM BAPTA는 토끼와 기넉픽에서도 두 번째 피크 전류를 대부분 억제하였다. 그러나 10 mM BAPTA는 흰쥐 심실근세포와 달리 토끼와 기넉픽에서 첫 번째 피크를 다소 억제하는 경향을 보였다. 또한 BAPTA가 존재할 때 흰쥐 심실근세포와 달리 BayK 8644는 BAPTA로 억제되는 두 번째 피크를 증가시키지 않았다. 토끼와 기넉픽에서도 0Na으로 억제되는 전류는 BAPTA에 의해 억제되는 전류와 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류로 구분되고 있다. 그러나 BAPTA로 억제되지 않는 전류는 흰쥐 심실근세포와 달리 BayK 8644에 의해 CDI를 감소시켰을 때 증가하지 않았다. BayK 8644 처치군의 결과에서 BAPTA로 억제되지 않는 전류의 비율은 토끼와 기넉픽에서 각각 31.4%와 20.0%로 흰쥐에 비해 낮은 비율을 보여주고 있다.

3.9 근소포체의 ryanodine 수용체와 NCX의 상호작용

그림 17은 caffeine으로 근소포체 Ca^{2+} 을 유리시킨 후 유리된 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 배출되면서 발생하는 내향 NCX 전류를 보여 주고 있다. BAPTA가 존재하지 않는 상태에서 -60 mV로 막전압을 고정한 후 caffeine을 처리할 경우 흰쥐와 토끼에서 내향 NCX 전류가 크게 발생하였다. 하지만 흰쥐 심실근세포의 경우 10 mM BAPTA는 caffeine 처리로 발생한 내향 NCX 전류를 완전히 사라지게 한 반면에 토끼 심실근세포의 경우에는 10 mM BAPTA 투석 후에도 내향 NCX 전류가 잘 보존되었다. 이와 같은 결과는 흰쥐 심실근세포에서 10 mM BAPTA에 의해 형성된 Ca^{2+} micro-domain에 ryanodine 수용체가 배제되어 있음을 의미하고 반면에 토끼의 경우에는 10 mM BAPTA로 형성된 Ca^{2+} micro-domain에 ryanodine 수용체가 포함되어 있음을 의미한다.

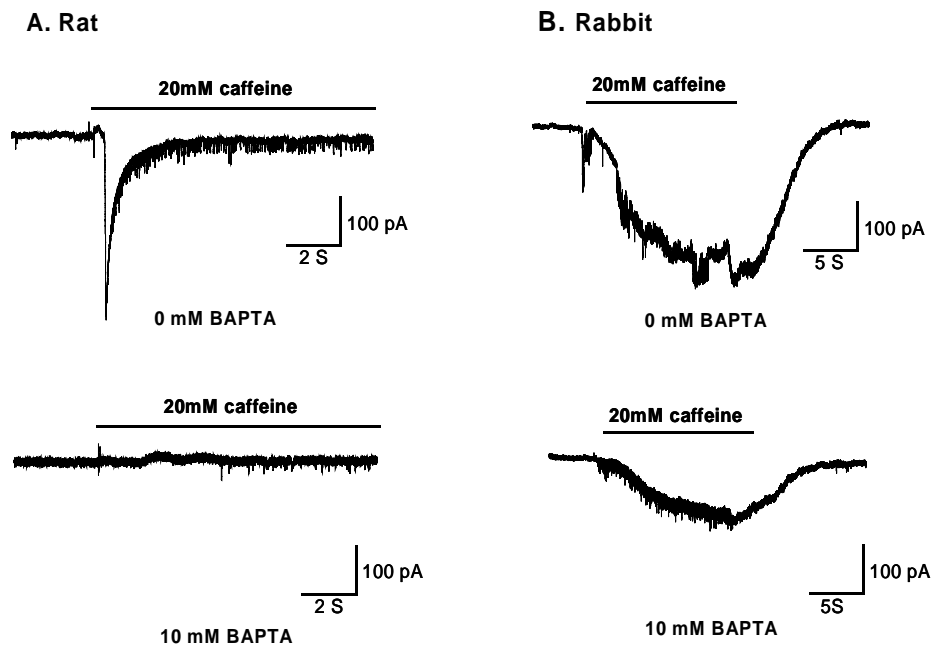


그림 17. 근세포 내 유리 Ca^{2+} 으로 발생한 내향 NCX 전류에 BAPTA가 미치는 영향. 흰쥐(A)와 토끼(B) 심실근세포에서 -60 mV로 막전압을 고정한 후 10초 동안 20 mM caffeine 처치에 의해 발생한 실제 내향 NCX 전류와 10 mM BAPTA 처치 후 억제되는 실제 내향 NCX 전류.

제4장 고찰

본 연구의 주요한 발견은 0Na으로 억제되는 전류에서 BayK 8644 처치 후 BAPTA로 억제되지 않는 전류가 흰쥐, 토끼, 기넌픽 심실근세포에서 각각 64%, 31%, 20% 존재하고 있으며 BAPTA로 형성되는 Ca^{2+} micro-domain은 흰쥐의 경우 ryanodine 수용체가 배제 되어있는 반면에 토끼의 경우 ryanodine 수용체를 포함하고 있다는 것이다.

본 연구에서 Ca^{2+} 대신에 Ba^{2+} 으로 대체하여 발생한 Ba^{2+} 전류는 0Na으로 억제되지 않기 때문에 0Na으로 억제되는 전류는 Ca^{2+} 과 Na^+ 에 의해 매개되는 전류이며 NCX의 봉쇄에 의해 억제되는 전류이다. NCX의 봉쇄에 의한 전류의 억제는 두 개의 다른 내향 전류의 봉쇄에 기인할 것으로 예상된다. 첫째로 0Na에 의한 NCX의 봉쇄는 L-type Ca^{2+} 통로 주위의 Ca^{2+} 농도를 증가시켜 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 강화시키게 되고 결국 L-type Ca^{2+} 전류를 억제하였을 것이다. 둘째로 NCX는 한 분자의 Ca^{2+} 이온과 세분자의 Na^+ 을 맞교환하며 Ca^{2+} 이동과 반대 방향으로 전류를 발생하기 때문에 NCX를 통한 Ca^{2+} 의 배출은 내향 NCX 전류를 발생한다. 따라서 0Na에 의한 NCX의 봉쇄는 직접적으로 내향 NCX 전류를 봉쇄하였을 것이다. 흥미롭게도 본 연구에서 0Na으로 억제되는 전류의 시간에 따른 변화는 두 번째 피크를 포함하는 BAPTA에 의해 억제되는 전류와 첫 번째 피크를 포함하는 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류로 구분되고 있다.

흰쥐에서 0Na으로 억제되는 전류에서 두 번째 피크는 ryanodine 처치 후 발생하였고 isoproterenol 처치로 더욱 크게 증가하였으며 BAPTA에 의해 억제되었다. 0Na으로 억제되는 전류의 두 번째 피크가 isoproterenol 처치 후 더 크게 증가하였음을 고려한다면 BayK 8644의 처치는 isoproterenol 보다 두 번째 피크를 더 크게 증가시킬 가능성이 있을 것이다. 왜냐하면 그림 3에서 보듯이 흰쥐 심실근세포에서 BayK 8644의 처치는 전하 유입량을 159% 증가시켰으며 이 값은

isoproterenol의 41% 증가와 비교하여 3배 이상 크기 때문이다. 하지만 isoproterenol과 달리 BayK 8644는 두 번째 피크를 오히려 억제하였고 피크에 도달하는 시간을 오른쪽으로 이동시켰다. BayK 8644가 isoproterenol보다 L-type Ca^{2+} 통로의 전하 유입량을 크게 증가시켰음에도 불구하고 두 번째 피크가 오히려 억제되는 것은 BayK 8644의 다른 작용 즉 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 제거 효과가 Ca^{2+} 유입량의 증가에 의해 강화되고 있는 두 번째 피크의 증가를 사라지게 하고 있음을 의미할 것이다(Tiaho 등 1990; Adachi-Akahane 등, 1999). BayK 8644의 CDI 제거 효과가 0Na으로 억제되는 전류의 두 번째 피크를 억제하고 있음을 볼 때 결국 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI의 강화는 0Na 처치 후 두 번째 피크의 발생과 증가에 주요한 기전으로 작용하고 있음을 알 수 있다.

이와 같은 두 번째 피크는 ryanodine 처치로 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 CDI의 제거와 isoproterenol 처치로 L-type Ca^{2+} 통로의 활성 변화에 의해 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 양이 증가함으로써 증가하고 있음을 보여 주고 있다(Adachi-Akahane 등, 1996; Sham 등 1995). 심근에서 심근 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 의 대부분이 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 과 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 인 것으로 볼 때(Bers, 2002) ryanodine으로 근소포체 유리 Ca^{2+} 을 봉쇄한 후에는 활성 Ca^{2+} 의 대부분이 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 이 될 것이다. 그러므로 ryanodine 처치 후 0Na으로 억제되는 전류에서 BAPTA에 의해 억제되는 전류의 두 번째 피크와 관련된 CDI의 주요한 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 이라는 것은 명백할 것이다. 더구나 근소포체의 유리 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 65~75%를 관여하고 있기 때문에(Balke 및 Wier, 1991; Sham, 1997; Adachi-Akahane 등, 1996; Sham 등 1995; Sipido 등, 1995) 근소포체의 유리 Ca^{2+} 의 봉쇄는 근소포체의 유리 Ca^{2+} 에 의한 상당량의 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 제거함으로써 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 양을 크게 증가시키게 될 것이다. 결국 심근 세포에서 ryanodine 처치 후 0Na으로 억제되는 전류의 두 번째 피크는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 이 NCX 봉쇄로 배출되지 않아 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 강화시킴으로써 Ca^{2+} 전류를 더 강하게

억제하여 발생된 것이라는 것을 의미하게 된다. L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의한 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화는 isoproterenol의 처치로 0Na으로 억제되는 전류의 두 번째 피크가 더 크게 증가되는 결과를 볼 때 더욱 명확해 진다.

0Na으로 억제되는 전류에서 두 번째 피크의 특성은 토끼와 기넌픽에서도 흰쥐의 경우와 유사한 결과를 보였다. 즉 ryanodine 처치로 0Na으로 억제되는 두 번째 피크는 증가하였고 ryanodine 처치로 증가한 두 번째 피크는 BayK 8644 처치에 의해 억제되었다. 토끼와 기넌픽에서도 흰쥐와 마찬가지로 0Na으로 억제되는 전류에서 두 번째 피크가 BayK 8644 처치로 억제되는 것으로 볼 때 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 의한 것임을 의미하게 되고 ryanodine 처치로 근소포체 유리 Ca^{2+} 에 의한 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 제거함으로써 증가하는 것으로 볼 때 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의한 CDI의 강화에 의한 것임을 의미하게 된다. 하지만 흰쥐의 경우 0Na으로 억제되는 전류에서 두 번째 피크는 ryanodine 처치 후 새로이 발생하는 반면에 토끼와 기넌픽의 경우 두 번째 피크는 이미 대조군에서도 존재하고 있다. 토끼와 기넌픽의 대조군에서 두 번째 피크의 존재는 흰쥐와 달리 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의한 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화 외에 또 다른 기전에 의한 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화가 존재할 가능성이 있음을 의미하게 될 것이다(Kohmoto 등, 1994; Levi 등, 1994; Grantham 및 Cannell, 1996; Leblanc 및 Hume, 1990). 이러한 가능성은 고찰의 후반부에서 다시 기술하겠다.

한편 BAPTA에 의해 억제되는 전류와 달리 0Na으로 억제되는 전류에서 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류는 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI의 제거에 의해 감소되지 않았다. BAPTA로 억제되지 않는 전류는 대조군에 비해 ryanodine 처치로 증가하였으며 ryanodine으로 증가한 전류는 BayK 8644 처치로 흰쥐에서 오히려 증가하였고 토끼와 기넌픽에서는 BayK 8644 처치로 감소되지 않았다. BayK 8644의 CDI 제거 효과가 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류를 억제하지 않는 것으로 볼 때 이러한 전류는 CDI와 무관한 전류라는 것을 의미하게 될 것이다. 앞

에서 설명하였듯이 0Na으로 억제되는 전류는 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 의해 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류와 NCX 봉쇄에 의한 내향 NCX 전류로 구분할 수 있다. 흥미롭게도 본 실험에서 0Na으로 억제되는 전류는 두 번째 피크를 포함하는 BAPTA에 의해 억제되는 전류와 첫 번째 피크를 포함하는 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류로 구분되고 있다. 그러므로 BAPTA에 의해 억제되는 전류가 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 억제라면 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류는 결국 NCX가 Ca^{2+} 을 배출하면서 발생하는 내향 NCX 전류가 될 것이다.

더욱이 이러한 BAPTA로 억제되지 않는 전류는 BAPTA가 세포내 Ca^{2+} transient를 사라지게 함으로써 Ca^{2+} 의 확산을 국소부위로 제한하기(Rousset 등 2004, Stern, 1992; Sham, 1997) 때문에 BAPTA에 의해 형성된 L-type Ca^{2+} 통로와 동일한 Ca^{2+} micro-domain 안에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 배출하면서 발생하는 내향 NCX 전류가 될 것이다. 따라서 BAPTA로 억제되지 않는 전류는 전체 NCX 활성 중 L-type Ca^{2+} 통로와 동일한 Ca^{2+} micro-domain 안에 존재하는 NCX의 활성 비율이 될 것이다. 이러한 비율은 BayK 8644로 CDI를 부분적으로 제거한 후에 흰쥐의 경우 38.6%에서 64.2%로, 토끼의 경우 17.5%에서 31.4%로 기넉픽의 경우 19.6%에서 19.9%로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 비율의 변화는 실험적으로 CDI를 제거함으로써 비율이 증가하고 있음을 보여주고 있다. 그러므로 BayK 8644 처치 후 CDI가 완벽히 제거되지 않았다면 실제 L-type Ca^{2+} 통로와 동일한 기능적 Ca^{2+} micro-domain 내의 NCX 활성은 위의 비율보다 더 높아질 것이다. 결국 L-type Ca^{2+} 통로와 동일한 Ca^{2+} micro-domain 안에서 NCX의 활성이 적어도 흰쥐, 토끼, 기넉픽에서 각각 64%, 31%, 20% 이상이 된다는 것을 의미한다.

한편 NCX는 한 분자의 Ca^{2+} 과 세분자의 Na^+ 을 맞교환하기 때문에 Ca^{2+} 을 배출하면서 한 분자의 Na^+ 이동 방향으로 내향 전류를 발생한다(Kimura 등, 1986; Mechmann 및 Pott, 1986; Bridge 등, 1990). 따라서 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로와

동일한 기능적 micro-domain에 존재한다는 것은 결국 두 전류의 시간차를 매우 짧게 만들 것이며 결국 실험적으로 측정된 Ca^{2+} 전류에는 NCX를 통해 Ca^{2+} 을 배출하며 발생하는 내향 NCX 전류가 포함되어 있게 될 것이다. L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 은 2가 양이온의 내향 전류를 발생하며 NCX에 의한 Ca^{2+} 의 배출은 Na^+ 에 의한 1가 양이온의 내향 NCX 전류를 발생하게 된다. 그러므로 이론적으로 내향 NCX 전류는 L-type Ca^{2+} 전류의 1/2에 해당하는 전류를 발생한다. 만약 NCX가 기능적으로 같은 Ca^{2+} micro-domain 안에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 모두 배출한다면 내향 NCX의 전류는 실험적으로 발생한 Ca^{2+} 전류의 최대 1/3(33.4%)가 될 것이다. 하지만 이번 실험에서 BAPTA가 존재할 때 BayK 8644 처치 후 0Na으로 억제되는 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량은 흰쥐, 토끼, 기넌픽에서 각각 22%, 11%, 10%를 보여주고 있다. 이것은 이번 실험 조건에서 발생한 L-type Ca^{2+} 전류에 내향 NCX 전류가 적어도 흰쥐, 토끼, 기넌픽에서 각각 22%, 11%, 10% 포함되어 있음을 의미하게 된다. 한편 0Na으로 억제되는 전류의 시간에 따른 변화에서 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류의 첫 번째 피크는 잘 보존되어 있다. BAPTA에 의해 억제되는 두 번째 피크가 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 의해 발생되는 전류라면 결국 첫 번째 피크는 CDI가 발생하기 전에 NCX를 통해 배출되는 전류라 할 수 있다. 따라서 L-type Ca^{2+} 전류에 포함된 NCX 전류는 또한 L-type Ca^{2+} 전류의 최대 피크 크기에도 영향을 미치고 있을 것이다. 그러나 막전압의 변화에 의해 발생하는 축전 전류(capacitance current)가 whole cell patch 구성 상태와 처치 약물에 따라 변화되기 때문에 첫 번째 피크의 정량적인 분석은 현재의 실험조건에서 어려움이 있다.

10 mM BAPTA는 컴퓨터 시뮬레이션에서 Ca^{2+} 의 확산을 40 nm 이하로 제한하는 것으로 알려져 있다(Stern, 1992; Sham, 1997; Adachi-Akahane 등, 1996). 따라서 10 mM BAPTA로 형성되는 Ca^{2+} micro-domain은 L-type Ca^{2+} 통로 주위의 세포질면 쪽 근막 아래의 좁은 범위로 제한되게 되고 또한 NCX의 봉쇄에 의한 반응은 이러한 제한된 범위에서 일어나는 반응이 될 것이다. 한편 심장에서 L-type Ca^{2+} 통로의 대부분은 t-tubule의 dyad 내에 집중되어 있으므로(Takagishi

등, 2000; Carl 등, 1995; Kawai 등, 1999; Musa 등, 2002; Scriven 등, 2000; Doly 등, 1986; Frank 등, 1992) 이번 실험에서 얻어진 Ca^{2+} micro-domain의 대부분은 dyadic cleft가 될 것이다. 또한 조직 면역학 방법을 이용한 측정으로부터 dyad의 폭이 약 100~200 nm이고 dyad의 두 막간 거리가 12~15 nm 임을 감안한다면(Soeller 및 Cannell, 1999; Sun 등, 1995; Franzini-Armstrong 등, 1999, Langer 및 Peskoff, 1996) 10 mM BAPTA로 형성되는 Ca^{2+} micro-domain은 dyadic cleft 내에 충분히 포함하게 된다. 그러므로 0Na으로 억제되는 Ca^{2+} 전류에서 BAPTA에 의해 억제되지 않는 전류가 존재한다는 결과는 결국 dyadic cleft 내에 NCX가 존재하고 있다는 기능적인 증거를 제시하게 될 것이다.

한 걸음 더 나아가 이전의 보고는 흰쥐 심실근세포에서 근소포체 유리 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 배출되면서 발생하는 내향 NCX 전류가 고농도의 Ca^{2+} 완충제의 존재 하에서 사라지는 결과를 얻음으로써 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로와 근소포체의 ryanodine 수용체를 포함하는 기능적 Ca^{2+} micro-domain으로부터 배제되어 있다고 결론을 내렸다(Adachi-Akahane 등, 1996). 반면에 기넝피에서 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 은 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리할 수 있음을 보이면서 NCX가 dyadic cleft 내에서 ryanodine 수용체와 근접하여 존재하고 있음을 제시하였다(Leblanc 및 Hume, 1990). 이러한 기능적 연구의 결과는 NCX가 dyadic cleft 내에 존재하고 있는지 혹은 dyadic cleft 밖에 존재하고 있는지에 대한 많은 논란을 유발하였다. 그림 17에서 보듯이 이번 연구에서도 caffeine 처리로 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리한 후 발생하는 내향 NCX 전류는 10 mM BAPTA에 의해 흰쥐 심실근세포에서 사라지는 반면에 토끼 심실근세포에서는 잘 보존되어 있었다. 이와 같은 결과는 이전의 연구 결과와 마찬가지로 흰쥐의 경우 NCX가 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로인 ryanodine 수용체와 기능적으로 분리되어 있음을 재확인하며 반면에 토끼와 기넝피는 NCX와 ryanodine 수용체가 기능적으로 같은 Ca^{2+} micro-domain안에 존재하고 있음을 의미하게 된다. 따라서 이번 실험에서 BAPTA로 형성된 기능적 Ca^{2+} micro-domain은 흰쥐의 경우 L-type Ca^{2+} 통로와 NCX를 포함하고 있지만 ryanodine 수용체는 배제되어 있음을 의미하며 반면에 토끼와 기넝피의 경우

L-type Ca^{2+} 통로와 NCX 그리고 ryanodine 수용체 모두를 포함하고 있음을 의미하게 된다.

흰쥐에서 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적인 Ca^{2+} micro-domain에 존재하고 ryanodine 수용체가 배제되어 있다면 흰쥐의 대조군에서 비록 근소포체의 Ca^{2+} 유리가 존재하다 할지라도 0Na처치로 축적되는 대부분의 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 될 것이다. 이와 대조적으로 토끼의 경우 ryanodine 수용체가 NCX와 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적인 Ca^{2+} micro-domain에 존재하기 때문에 대조군에서 0Na으로 축적되는 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 될 것이다. 따라서 대조군에서 흰쥐의 경우 0Na 처치 후 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화는 주로 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의해 일어나게 되고 반면에 토끼와 기넌픽의 경우 0Na 처치 후 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 일어나게 될 것이다. 토끼와 기넌픽에서 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 0Na 처치 후 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 강화에 일부 기여하고 있음은 0Na으로 억제되는 전류에서 BAPTA에 억제되는 전류의 두 번째 피크가 흰쥐와 달리 토끼와 기넌픽의 경우 대조군에서도 존재하고 있는 이유의 일부를 설명할 수 있을 것이다. 그러나 토끼와 기넌픽의 경우 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 의 양은 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 의 30%를 제공함으로써 흰쥐의 8%에 비해 월등히 많은 양의 Ca^{2+} 이 유입되게 된다. 이렇게 유입된 많은 양의 Ca^{2+} 은 NCX 봉쇄 후 더 강하게 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 강화시키게 될 것이다. 그러므로 토끼와 기넌픽의 대조군에서 0Na으로 억제되는 전류에서 두 번째 피크의 존재는 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} micro-domain에 ryanodine 수용체의 존재와 L-type Ca^{2+} 통로의 활성 차이에 기인하였을 가능성이 클 것이다. 그러나 본 실험에서는 토끼와 기넌픽의 대조군에서 두 번째 피크에 기여하는 Ca^{2+} 을 명확히 구분하는 것은 사실 어렵다. 이 부분은 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

다른 한편 ryanodine 처치 후 증가하는 0Na 으로 억제되는 두 번째 피크는 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도가 낮아 졌음을 고려할 때 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 더 강화시켰음을 의미할 것이다. 실제로 모든 종에서 근소포체의 유리 Ca^{2+} 의 억제는 세포내 Ca^{2+} 농도를 크게 감소시켰다. 또한 활동전압 기간 동안 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도는 근소포체의 유리 Ca^{2+} 이 존재 하지 않을 때 42 μM 에서 10 μM 로 감소하기 때문에(Peskoff 및 Langer, 1998; Soeller 및 Cannell, 1997; Cannell 및 Soeller, 1997) dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도도 또한 감소하게 된다. 더구나 근소포체의 유리 Ca^{2+} 을 봉쇄한 후 isoproterenol의 처치로 L-type Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입량이 소량 증가하였을 때 0Na 으로 억제되는 두 번째 피크는 더 크게 증가하였다. (그림 6A,B). 그러므로 이러한 결과는 두 개의 중요한 결과를 유추할 수 있을 것이다. 첫째로 심근세포에서 0Na 으로 억제되는 두 번째 피크는 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도가 매우 낮은 상태에서 증가하였기 때문에 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI는 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 농도에 의해 결정되지 않는다는 것이다. 둘째로 심근세포에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 과 근소포체 유리 Ca^{2+} 중에 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI의 발생에 있어 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 결정적이라는 것이다. 이것은 본 실험에서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI의 강화가 근소포체의 유리 Ca^{2+} 의 제거한 상태에서 isoproterenol의 처치로 Ca^{2+} 유입량의 증가함에 따라 오히려 더 강화되고 있음을 보여 주고 있기 때문이다. 이와 같은 결과는 최근의 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 대한 kinetic 모델을 빌어 설명할 수 있을 것이다(Markevich 등, 2005). 이들은 L-type Ca^{2+} 통로의 CI 부위에 두 개의 다른 알로스테릭 Ca^{2+} 결합 부위 (slow binding site와 fast binding site)가 있다는 것을 제시하였다. 그들은 Ca^{2+} 통로를 통해 들어온 Ca^{2+} 이 결합하는 slow binding site는 CDI를 개시하고 CDI의 시상수를 결정하는 반면에 fast binding site에는 CDI가 발생한 후 다른 곳으로부터 기원하는 Ca^{2+} 이 결합하여 CDI를 안정시킨다고 제안하였다. 따라서 현재의 실험 결과와 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 대한 kinetic 모델에 대한 가설을 고려하였을 때 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 은 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 결정적이라는 것을 의미하게 될 것이다. 하지만 본 연구에서는 NCX가 L-type Ca^{2+}

통로와 기능적으로 같은 Ca^{2+} micro-domain에 존재하여 세포로 유입된 Ca^{2+} 을 CDI가 유발되기 전에 곧바로 세포 밖으로 배출하고 있기 때문에 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 의 대부분이 CDI를 유발하지 못하게 됨을 보여 주고 있다.

본 연구의 또 다른 생리학적 의미는 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적 Ca^{2+} micro-domain에 존재함으로써 심근의 E-C coupling gain을 조절할 가능성을 보여주고 있다는 것이다. 이런 가능성은 NCX를 homozygous overexpression 시킨 동물모델에서 NCX의 활성 증가는 심근의 E-C coupling gain(근소포체로부터 유입된 Ca^{2+} /L-type Ca^{2+} 전류)을 감소시킨다고 보고한 결과와 일치하는 결과이다 (Reuter 등, 2004). 본 실험에서 NCX는 BAPTA로 형성되는 L-type Ca^{2+} 통로와 동일한 Ca^{2+} micro-domain에 존재하면서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 배출하고 있음을 보여주고 있다. 이것은 NCX가 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 배출함으로써 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리하기 위해 필요한 활성 Ca^{2+} 을 감소시켜 근소포체로부터 Ca^{2+} 유리를 감소시키는 결과를 초래하게 될 것이다. 결국 근소포체의 유리 Ca^{2+} 의 감소는 심근 세포의 E-C coupling gain을 감소시키게 될 것이다. 한편 0Na 으로 억제되는 전류에서 BAPTA로 억제되지 않는 전류는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 Ca^{2+} 유입이 되면서 발생하는 전류가 아닌 Ca^{2+} 이 배출되면서 발생하는 NCX 전류이다. 따라서 L-type Ca^{2+} 전류에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 과 상관없는 전류의 존재는 실제 E-C coupling gain의 측정에 있어 잘못된 측정을 유발할 수 있게 될 것이다.

본 연구는 NCX가 dyadic cleft 내에도 존재함으로써 심근의 이완 기전 외에도 수축의 강도를 조절할 수 있을 가능성을 보여주고 있다. 현재까지 NCX은 이완기 동안 세포내 Ca^{2+} 을 배출하면서 주로 심근의 이완 기전으로 작용하는 것으로 알려져 왔다(Bers, 2002; Adachi-Akahane 등 1997; Terracciano 등, 1988; Yao 등, 1998). 그러나 이번 연구는 비록 중간 dyadic cleft 내의 NCX의 활성이 다르긴 하지만 이러한 공간 안에서 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 이 CICR을 유발하기 전에 NCX를 통해 배출될 가능성을 보여주고 있다. Dyadic cleft 내에서

NCX의 Ca^{2+} 의 배출은 Ca^{2+} 이 세포질로 확산되어 세포내 Ca^{2+} transient를 발생하기 전에 일어나기 때문에 결국 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가 속도에 영향을 미치게 될 것이다. 더구나 토끼와 기넌픽의 경우 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 뿐만 아니라 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 도 배출하고 있기 때문에 두 종은 흰쥐보다도 Ca^{2+} 농도의 증가 속도에 더 크게 영향을 미치게 될 것이다. 따라서 dyadic cleft 내에 NCX 존재는 세포내 Ca^{2+} 농도의 변동에 있어 Ca^{2+} 농도의 감소와 증가 속도 모두를 조절하는데 관여하고 있을 가능성이 있음을 암시한다. 그러나 dyadic cleft 내의 Ca^{2+} 의 순환은 NCX 뿐만아니라 세포막의 Ca^{2+} 완충 역할과 세포막의 표면 전하 효과 등을 또한 고려하여야 할 것이다(Langer 및 Peskoff, 1997; Wang 등, 1996).

결론적으로 NCX는 BAPTA로 형성된 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 Ca^{2+} micro-domain 내에 적어도 흰쥐, 토끼, 기넌픽에서 각각 64%, 31%, 20%가 존재함으로써 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 보다 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI에 더 크게 영향을 미치고 있는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 을 배출하면서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 조절하고 있다. 이처럼 Ca^{2+} 통로와 기능적으로 같은 Ca^{2+} micro-domain에 NCX가 존재하여 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 배출한다는 것은 결국 근소포체 유리 Ca^{2+} 양을 감소시켜 심근의 E-C coupling gain을 감소시키고 세포내 Ca^{2+} transient의 변동에 있어 세포내 Ca^{2+} 의 증가 속도를 조절하고 있을 가능성이 있음을 의미하게 될 것이다. 하지만 NCX에 의한 수축 기전의 조절 가능성은 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

제5장 결론

효소로 분리한 흰쥐, 토끼, 기넌픽의 심실근세포에서 NCX와 L-type Ca^{2+} 통로의 상호작용을 규명하기 위하여 BAPTA가 존재할 때와 존재하지 않을 때 탈분극 자극에 의해 발생하는 L-type Ca^{2+} 전류에 포함되어 있는 내향 NCX 전류를 약리학적인 방법을 이용하여 분리하여, 10 mM BAPTA 존재 유무에 따른 크기를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흰쥐 심실근세포에서 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량을 $45.3 \pm 4.3\%$ 억제하였고, 0Na으로 억제되는 실제 전류는 10 ms 근처에서 피크를 이루었다.
2. Ryanodine 처치로 근소포체의 Ca^{2+} 유리를 봉쇄할 경우 L-type Ca^{2+} 전류의 전하 유입량은 $62.0 \pm 22.4\%$ 증가하나, 0Na은 여전히 전하 유입량을 $48.8 \pm 7.7\%$ 억제하였다. 이때 0Na으로 억제되는 실제 전류는 10 ms 근처에서 이루어지는 첫 번째 피크에 이어 새로이 20 ms 근처에서 두 번째 피크를 발생하였다.
3. 10 mM BAPTA 처치는 흰쥐 심실근세포내 Ca^{2+} transient를 완전히 사라지게 하였으나, 0Na으로 봉쇄되는 전류를 완전히 봉쇄하지는 못하였다. 특히 0Na으로 봉쇄되는 실제 전류에서 나타나는 첫 번째 피크는 억제하지 않는 반면, ryanodine 처치로 발생하는 두 번째 피크는 완전히 봉쇄하였다.
4. Ryanodine 전처치로 새로이 발생하는 두 번째 피크는 isoproterenol 처치로 더 크게 증가하였지만, BayK 8644 처치 시에는 그 크기가 오히려 억제되며 오른 쪽으로 이동되었다. 반면, 두 약물은 10 mM BAPTA 처치시 잔류하는 전류를 증가시켰으며, 결과적으로 0Na으로 봉쇄되는 전체 전류에서 BAPTA로 억제되지 않는 전류의 비율은 BayK 8644 처치 후 38.6%에서 64.2%로 증가하였다.
5. 토끼와 기넌픽의 경우 0Na으로 봉쇄되는 실제 전류는 흰쥐에서와는 달리 대조군에서 이미 2개의 피크를 이루었다. Ryanodine 처치는 두 번째 피크를 증가시켰고, isoproterenol 및 BayK 8644 처치는 흰쥐와 유사한 반응을 나타내었으나, BayK 8644 처치 후 최대가 되는 BAPTA로 억제되지 않는 전류의 비율이

토끼와 기넉픽에서 각각 31.4%와 19.9%로 흰쥐에서보다 감소하였다.

이상의 결과로부터, NCX는 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 기능적 Ca^{2+} micro-domain내에 적어도 흰쥐, 토끼, 기넉픽에서 각각 64%, 31%, 20%가 존재함으로써 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI 유발 작용이 근소포체로부터 유리되는 Ca^{2+} 보다 더 우수한 작용을 발현하는 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 을 배출하면서 L-type Ca^{2+} 통로의 CDI를 조절하고 있다는 결론을 얻었다.

참고문헌

Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. Cross-signaling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 1996; 108: 435-454.

Adachi-Akahane S, Cleemann L, Morad M. BAY K 8644 modifies Ca^{2+} cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276: H1178-1189.

Adachi-Akahane S, Lu L, Li Z, Frank JS, Philipson KD, Morad M. Calcium Signaling in Transgenic Mice Overexpressing Cardiac $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger. *J. Gen. Physiol.* 1997; 109: 717-729.

Anderson ME. Ca^{2+} -dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca^{2+} Channels: is a Unifying Mechanism at Hand? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001; 33: 639-650.

Balke CW, Wier WG. Ryanodine does not affect calcium current in guinea pig ventricular myocytes in which Ca^{2+} is buffered. *Circ Res* 1991; 68: 897-902.

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 1994; 476: 279-293.

Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* edn 2 (Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 2001). 2001.

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

Bers DM. Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange Function in Rabbit, Mouse and Man: What's the Difference? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34: 369-373.

Bers DM, Bassani JWM, Bassani RA. Na-Ca Exchange and Ca Fluxes during Contraction and Relaxation in Mammalian Ventricular Muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; 779: 430-442.

Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Regulation of unloaded cell shortening by sarcolemmal sodium-calcium exchange in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1993; 469: 583-599.

Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Role of sodium-calcium exchange in activation of contraction in rat ventricle. *J Physiol (Lond)* 1993; 472: 391-413.

Brette F, Komukai K, Orchard CH. Validation of formamide as a detubulation agent in isolated rat cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1720-1728.

Brette F, Orchard C. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2003; 92: 1182-1192.

Bridge JH, Smolley JR, Spitzer KW. The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and $\text{I}_{\text{Na-Ca}}$ in cardiac myocytes. *Science* 1990; 248: 376-378.

Cannell MB, Soeller C. Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad. *Biophys J.* 1997; 73: 112-122.

Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Ball WJ, Jr., Vaghy PL, et al. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 673-682.

Delgado C, Artiles A, Gomez AM, Vassort G. Frequency-dependent Increase in Cardiac Ca^{2+} Current is due to Reduced Ca^{2+} Release by the Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31: 1783-1793.

Doyle DD, Kamp TJ, Palfrey HC, Miller RJ, Page E. Separation of cardiac plasmalemma into cell surface and T-tubular components. Distribution of saxitoxin- and nitrendipine-binding sites. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 6556-6563.

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

Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 1985; 85: 247-289.

Fowler MR, Dobson RS, Orchard CH, Harrison SM. Functional consequences of detubulation of isolated rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 2004; 62: 529-537.

Frank JS, Mottino G, Reid D, Molday RS, Philipson KD. Distribution of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J. Cell Biol.* 1992; 117: 337-345.

Grantham CJ, Cannell MB. Ca²⁺ Influx During the Cardiac Action Potential in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Circ Res* 1996; 79: 194-200.

Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovascular Research* 1998; 37: 279-289.

Henderson SA, Goldhaber JJ, So JM, Han T, Motter C, Ngo A, et al. Functional Adult Myocardium in the Absence of Na⁺-Ca²⁺ Exchange: Cardiac-Specific Knockout of NCX1. *Circ Res* 2004; 95: 604-611.

Hove-Madsen L, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1993; 73: 820-828.

Isenberg G. Cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 1977; V371: 61-69.

Isenberg G, Klöckner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 1982; V395: 30-41.

Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ Res* 1984; 54:

144-156.

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.

Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H603-609.

Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels (CaV1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1743-1756.

Kieval RS, Bloch RJ, Lindenmayer GE, Ambesi A, Lederer WJ. Immunofluorescence localization of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in heart cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992; 263: C545-550.

Kimura J, Noma A, Irisawa H. Na^{+} - Ca^{2+} exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 1986; 319: 596-597.

Kohomoto O, Levi AJ, Bridge JH. Relation between reverse sodium-calcium exchange and sarcoplasmic reticulum calcium release in guinea pig ventricular cells. *Circ Res* 1994; 74: 550-554.

Langer GA, Peskoff A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophys J* 1996; 70: 1169-1182.

Langer GA, Peskoff A. Role of the Diadic Cleft in Myocardial Contractile Control. *Circulation* 1997; 96: 3761-3765.

Leblanc N, Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 1990; 248: 372-376.

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

Levi AJ, Spitzer KW, Kohmoto O, Bridge JH. Depolarization-induced Ca entry via Na-Ca exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 266: H1422-1433.

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274: H1335-1347.

Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2000; V439: 588-599.

Litwin SE, Li J, Bridge JHB. Na-Ca Exchange and the Trigger for Sarcoplasmic Reticulum Ca Release: Studies in Adult Rabbit Ventricular Myocytes. *Biophys. J.* 1998; 75: 359-371.

Markevich NI, Pimenov OY, Kokoz YM. Analysis of the modal hypothesis of Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Biophysical Chemistry*

2005; 117: 173-190.

Matsuda H, Noma A. Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea-pig.

H Matsuda and A Noma. *J Physiol* 1984; 357: 553-573.

Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR. Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovascular Research* 1998; 37: 424-431.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994; 74: 365-507.

Mechmann S, Pott L. Identification of Na^+ - Ca^{2+} exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 1986; 319: 597-599.

Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1985; 249: H1056-1060.

Musa H, Lei M, Honjo H, Jones SA, Dobrzynski H, Lancaster MK, et al. Heterogeneous Expression of Ca^{2+} Handling Proteins in Rabbit Sinoatrial Node. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 311-324.

Peskoff A, Langer GA. Calcium concentration and movement in the ventricular cardiac cell during an excitation-contraction cycle. *Biophys. J.* 1998; 74: 153-174.

Pott C, Goldhaber JI, Philipson KD. Genetic manipulation of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 322: 1336-1340.

Pott C, Yip M, Goldhaber JI, Philipson KD. Regulation of Cardiac L-Type Ca^{2+} Current in $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Knockout Mice: Functional Coupling of the Ca^{2+} Channel and the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger. *Biophys. J.* 2006: biophysj.106.091538.

Reuter H, Han T, Motter C, Philipson KD, Goldhaber JI. Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: Defects in excitation-contraction coupling. *Journal of Physiology* 2004; 554: 779-789.

Reuter H, Henderson SA, Han T, Matsuda T, Baba A, Ross RS, et al. Knockout mice for pharmacological screening: Testing the specificity of Na-Ca exchange inhibitors. *Circulation Research* 2002; 91: 90-92.

Ritter M, Sui Z, Philipson KD, Li F, Spitzer KW, Ishida H, et al. Ca^{2+} sparks induced by Na/Ca exchange. *Cell Calcium* 2003; 34: 11-17.

Rousset M, Cens T, Vanmau N, Charnet P. Ca^{2+} -dependent interaction of BAPTA with phospholipids. *FEBS Letters* 2004; 576: 41-45.

Scriven DRL, Dan P, Moore EDW. Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophys. J.* 2000; 79: 2682-2691.

Sham JS. Ca^{2+} release-induced inactivation of Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes: evidence for local Ca^{2+} signalling. *J Physiol (Lond)* 1997; 500:

285-295.

Sham JS, Hatem SN, Morad M. Species differences in the activity of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J Physiol (Lond)* 1995; 488: 623 - 631.

Sham JSK, Cleemann L, Morad M. Functional Coupling of Ca^{2+} Channels and Ryanodine Receptors in Cardiac Myocytes. *PNAS* 1995; 92: 121-125.

Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E. Inhibition and Rapid Recovery of Ca^{2+} Current During Ca^{2+} Release From Sarcoplasmic Reticulum in Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Circ Res* 1995; 76: 102-109.

Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low Efficiency of Ca^{2+} Entry Through the Na^+ - Ca^{2+} Exchanger as Trigger for Ca^{2+} Release From the Sarcoplasmic Reticulum : A Comparison Between L-Type Ca^{2+} Current and Reverse-Mode Na^+ - Ca^{2+} Exchange. *Circ Res* 1997; 81: 1034-1044.

Smith TW. Digitalis. Mechanisms of action and clinical use. *N Engl J Med* 1988; 318: 358-365.

Soeller C, Cannell MB. Numerical simulation of local calcium movements during L-type calcium channel gating in the cardiac diad. *Biophys J*. 1997; 73: 97-111.

Soeller C, Cannell MB. Examination of the Transverse Tubular System in Living Cardiac Rat Myocytes by 2-Photon Microscopy and Digital Image-Processing Techniques. *Circ Res* 1999; 84: 266-275.

Solaro RJ, Rarick HM. Troponin and Tropomyosin : Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments. *Circ Res* 1998; 83: 471-480.

Soldatov NM. Ca^{2+} channel moving tail: link between Ca^{2+} -induced inactivation and Ca^{2+} signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24: 167-171.

Stern MD. Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 1992; 13: 183-192.

Stern MD, Lakatta EG. Excitation-contraction coupling in the heart: the state of the question. *FASEB J.* 1992; 6: 3092-3100.

Stotz SC, Zamponi GW. Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca^{2+} channels. *Trends in Neurosciences* 2001; 24: 176-182.

Sun XH, Protasi F, Takahashi M, Takeshima H, Ferguson DG, Franzini-Armstrong C. Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 659-671.

Takagishi Y, Yasui K, Severs NJ, Murata Y. Species-specific difference in distribution of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels of cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1963-1969.

Terracciano CMN, Souza AI, Philipson KD, MacLeod KT. Na^+ - Ca^{2+} exchange and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} regulation in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing the Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *The Journal of*

Physiology 1998; 512: 651-667.

Tiaho F, Richard S, Lory P, Nerbonne JM, Nargeot J. Cyclic-AMP-dependent phosphorylation modulates the stereospecific activation of cardiac Ca channels by Bay K 8644. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 1990; 417: 58-66.

Trac M, Dyck C, Hnatowich M, Omelchenko A, Hryshko LV. Transport and Regulation of the Cardiac Na^+ - Ca^{2+} Exchanger, NCX1 Comparison between Ca^{2+} and Ba^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 1997; 109: 361-369.

Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 1980; 19: 2396-2404.

Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JGY. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Research in Cardiology* 1993; 88: 93-102.

Wang SY, Peskoff A, Langer GA. Inner sarcolemmal leaflet Ca^{2+} binding: its role in cardiac Na^+ / Ca^{2+} exchange. *Biophys J.* 1996; 70: 2266-2274.

Weber CR, Piacentino V, III, Ginsburg KS, Houser SR, Bers DM. Na^+ - Ca^{2+} Exchange Current and Submembrane $[\text{Ca}^{2+}]$ During the Cardiac Action Potential. *Circ Res* 2002; 90: 182-189.

Wibo M, Bravo G, Godfraind T. Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface

density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ Res* 1991; 68: 662-673.

Yang Z, Pascarel C, Steele DS, Komukai K, Brette F, Orchard CH. Na^+ - Ca^{2+} Exchange Activity Is Localized in the T-Tubules of Rat Ventricular Myocytes. *Circ Res* 2002; 91: 315-322.

Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, et al. Effects of Overexpression of the Na^+ - Ca^{2+} Exchanger on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transients in Murine Ventricular Myocytes. *Circ Res* 1998; 82: 657-665.

You Y, Pelzer DJ, Pelzer S. Modulation of L-type Ca current by fast and slow Ca buffering in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *Biophysical Journal* 1997; 72: 175-187.

ABSTRACT

Mechanism of Na^+ - Ca^{2+} Exchange-Induced Regulation of L-type Ca^{2+} Current in the Ventricular Myocyte

Ahn Sung Wan

Dept. of Medicine, The Graduate School
Yonsei University

In the heart, L-type Ca^{2+} channel (LTCC) is a major path, through which Ca^{2+} enters cell according to its concentration difference across the sarcolemma during activation. While Na^+ - Ca^{2+} exchange (NCX) contributes as a major path, through which Ca^{2+} is extruded from cell causing relaxation by exchanging 3Na^+ against 1Ca^{2+} . Recently, it has been suggested in the animal model overexpressing or knocking out cardiac-specific NCX that NCX might regulate Ca^{2+} -dependent inactivation (CDI) of LTCC. Therefore, this study is planned to clarify the interaction between LTCC and NCX, and its mechanism taking place especially in the same functional Ca^{2+} microdomain as the LTCC as well as its species differences. To achieve these goals, we directly measured and compared influence of NCX blocking after Na^+ -depletion (0Na) in the presence and absence of 10 mM BAPTA, a fast Ca^{2+} buffer, in the isolated single ventricular myocytes from the rat, rabbit and guinea-pig. The result were as followed;

1. In the rat ventricular myocytes, 0Na suppressed charge influx of I_{CaL} by $45.3\pm 4.3\%$ showing a single peak around 10 ms in time related change of the actual inward current suppressed by 0Na.
2. 0Na still suppressed the I_{CaL} charge influx by $48.8\pm 7.7\%$ even after SR Ca^{2+} release blocking with ryanodine, which increased the I_{CaL} charge influx by

62.0±22.4%. Interestingly, in this case, the second peak was newly developed around 20 ms immediately following the initial peak developed around 10 ms in its actual inward current suppressed by 0Na.

3. Internal dialysis of myocytes with 10 mM BAPTA, which completely abolished the intracellular Ca^{2+} transient, still preserved the 0Na-induced I_{CaL} suppression in spite of its reduced magnitude showing a complete suppression of the second peak but no suppression in the initial peak in the actual inward current suppressed by 0Na.
4. The second peak developed after ryanodine pretreatment was increased after isoproterenol, but rather slightly suppressed and shifted rightward after BayK 8644 increasing the BAPTA-resistant proportion of the total inward current suppressed by 0Na from 38.6% to 64.2%.
5. Contrastingly, in the cases of rabbit and guinea-pig, the actual inward current suppressed by 0Na showed two peak even in the absence of ryanodine pretreatment, which increased the second peak. The second peak was also increased after isoproterenol and slightly suppressed and shifted rightward after BayK 8644 as like in the rat. the BAPTA-resistant proportions of the total inward current suppressed by 0Na obtained after BayK 8644 were 31.4%, and 19.9% in rabbit, and guinea-pig, respectively.

From these results, it is concluded that NCX regulates CDI of the LTCC by extruding Ca^{2+} from cell immediately after its entry through the LTCC, but before it triggers CDI in the heart, because at least 64%, 31%, and 20% of NCX activity is concentrated in the same functional Ca^{2+} microdomain as the LTCC in the heart of rat, rabbit and guinea-pig, respectively.

Keyword: Na^+ - Ca^{2+} exchange, L-type Ca^{2+} channel, Ca^{2+} -dependent inactivation, BAPTA, Ryanodine, BayK 8644, Caffeine.