

심장 dyadic cleft에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$

교환 분포에 대한 중간 비교

연세대학교 대학원

의 학 과

진 호

심장 dyadic cleft에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$
교환 분포에 대한 중간 비교

지도 고 창 만 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

진 호

진호의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 12월 일

감사의 글

학자로서 곤은 길을 가시며 학문의 길로 인도해 주시고 본 연구를 진행함에 있어 아낌없는 지도와 세심한 배려를 베풀어 주신 고창만 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 논문의 심사위원으로서 많은 지도와 조언을 해주신 공인덕 교수님, 등영건 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

약리학교실에서 생활하면서 많은 격려를 해주신 최재원 교수님과 연세안과 현재현 원장님께 감사드리며 연구의 진행에 있어서 모든 것을 도맡아주신 안성완 선생님과 약리학교실 선생님들에게도 감사드립니다.

선배이시며 조언을 아끼지 않으셨던 생화학교실의 최종환 교수님, 손준형 선생님 과후배 우미경 부부에게도 고마운 마음 잊지 않고 있습니다.

연구에 전념할 수 있도록 배려해주신 엘바이오 전영삼 사장님과 김종식 차장님이하 모든 엘바이오 식구들에게도 고맙다는 인사를 전합니다. 항상 주위에서 응원해 주시는 테크노밸리 신명근 팀장님과 나의 친구 박은영, 미생물학교실 박수정 선생님께 감사한 마음을 전합니다.

끝으로 인생의 선배로써 이끌어주신 주성호, 한동섭, 오택주, 김일영 형님들과 이 작은 결실을 함께하고 싶습니다.

늘 저의 뒤에서 묵묵히 걱정해주시는 부모님과 큰형, 형수님, 작은형과 하나뿐인 조카 서현에게 조그만 선물이 되었으면 하는 바람입니다.

무엇보다도 언제나 든든한 후원자가 되어준 아내 혜원님과 장인어른, 장모님 그리고 처남과 곧 태어날 주니어 이삭에게도 작은 결실과 함께 하나님의 은총이 가득하기를 간절히 기도합니다.

2008 년 12 월

저자 씀

차 례

그림 차례	ii
국문 요약	iii
제 1 장. 서론	1
제 2 장. 재료 및 방법	5
2.1. 단일 심실근 세포의 분리	5
2.2. 전기 생리학 실험	6
2.3. 실험 용액 및 시약	6
2.4. 자료 분석	7
제 3 장. 결과	8
3.1. 흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 에 대한 $0Na$ 효과	8
3.2. 근소포체 유리 Ca^{2+} 제거후 $0Na$ 효과	12
3.3. 흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 에 대한 $0Na$ 효과	17
3.4. 근소포체의 ryanodine 수용체와 NCX의 상호작용	23
제 4 장. 고찰	25
제 5 장. 결론	32
참고 문헌	33
영문 요약	39

그림 차례

그림 1.	흰쥐 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제	10
그림 2.	흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 의 전류-전압 상관관계에 대한 Na^+ 배제의 영향	11
그림 3.	10 μM ryanodine 처치 한 흰쥐 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제	14
그림 4.	10 μM ryanodine을 투석한 흰쥐 심실근 세포에서 탈분극 전압에 따른 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량의 Na^+ 배제에 의한 영향	15
그림 5.	흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 중 0Na 으로 억제되는 최대 전류와 전하유입량 의 % 분율과 시상수에 미치는 10 μM ryanodine의 영향	16
그림 6.	토끼 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제	18
그림 7.	토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 의 전류-전압 상관관계에 대한 Na^+ 배제의 영향	19
그림 8.	10 μM ryanodine 처치 한 토끼 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제	20
그림 9.	10 μM ryanodine을 투석한 토끼 심실근 세포에서 탈분극 전압에 따른 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량의 Na^+ 배제에 의한 영향	21
그림 10.	토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 중 0Na 으로 억제되는 최대 전류와 전하유입량 의 % 분율과 시상수에 미치는 10 μM ryanodine의 영향	22
그림 11.	근소포체 유리 Ca^{2+} 으로 발생한 내향 NCX 전류에 BAPTA가 미치는 영향	24
그림 12.	흰쥐와 토끼 심실근 세포에서 BAPTA로 형성되는 기능적 Ca^{2+} microdomain의 예상되는 모식도.	31

심장 dyadic cleft에서 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환 분포에 대한 중간 비교

$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환은 세포막 내외에 존재하는 Na^+ 및 Ca^{2+} 의 농도차를 원동력으로 하여 Na^+ 과 Ca^{2+} 을 맞교환하는 수송체로 심근에서는 Ca^{2+} 배출을 주도하는 기전으로 역할하고 있다. 그러나 심근의 경우 Na^+ 및 Ca^{2+} 의 농도차와 아울러 막전위의 변동에 의해 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환은 활성 전압 초기에 일시적으로 Ca^{2+} 을 세포내로 유입시키기도 하며, 이때 유입된 Ca^{2+} 역시 L-type Ca^{2+} 통로를 통해 유입되는 Ca^{2+} 과 마찬가지로 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킨다는 보고가 제시되었다. 이러한 현상은 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로인 ryanodine 수용체가 집중되어 있는 dyadic cleft내에 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환이 공존하여 두 구조가 거리적으로 인접하여야 가능할 것이다. 그러나 이에 대한 조직학적 연구는 현존하는 연구 기법의 해상도의 한계로 인해 뚜렷한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 기능적인 측면에서도 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환에 의해 배출되는 Ca^{2+} 의 양이 전체 활성 Ca^{2+} 의 20 ~ 30 %인 토끼 및 기니픽 등에서는 이러한 보고가 명확하게 확인되어 기정사실로 받아들여지고 있지만, 그 양이 8 ~ 10 %로 적은 흰쥐 및 생쥐 등에서는 그렇지 못하다는 반론이 우세하여 혼란을 초래하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환을 통해 유입되는 Ca^{2+} 역시 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킨다는 사실을 추구하기 위한 일환으로, 고농도의 BAPTA에 의해 만들어지는 Ca^{2+} microdomain내에 ryanodine 수용체와 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 교환의 공존 여부를 토끼와 흰쥐에서 비교함으로써 이와 같은 종에 따른 차이가 나타나게 되는 원인을 규명하여 보고자 하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. Na^+ 배제는 10 mM BAPTA로 투석한 흰쥐 및 토끼의 심근 세포를 -30 mV에서 $+40$ mV까지 탈분극함으로 유발된 I_{CaL} 을 전압에 반비례하여 억제하였으며, $+40$ mV에서는 아무런 변동을 초래하지 못하였다.
2. 10 μM ryanodine 전처치 시 토끼 심근 세포의 경우에는 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 억제가 유의하게 감소되었으나, 흰쥐 심근 세포에서는 별다른 차이가 나타나지 않았다.
3. 10 mM caffeine 투여 시 토끼 심근 세포의 경우에는 10 mM BAPTA 존재에도 불구하고 내향성 NCX 전류가 발생되었으나, 흰쥐 심근 세포에서는 나타나지 않았다.

이상의 결과로 보아, 흰쥐 심근에서는 Na^+ - Ca^{2+} 교환이 L-type Ca^{2+} 통로와 ryanodine 수용체에 의해 형성되는 기능적 Ca^{2+} microdomain에서 배제되어 있는 반면, 토끼 심근에서는 이들 3가지 구조가 동일한 Ca^{2+} microdomain 내에 공존하고 있다.

핵심되는 말: Na^+ - Ca^{2+} 교환, L-type Ca^{2+} 통로, Ryanodine 수용체, BAPTA

심장 dyadic cleft에서 Na^+ - Ca^{2+} 교환 분포에 대한 중간 비교

<지도 교 창 만 교수>

연세대학교 대학원 의학과

진 호

제1장 서 론

심근은 약 200 nm 간격으로 규칙적인 배열을 하고 있는 t-tubule이 잘 발달되어 있다. 심근의 t-tubule안에는 근막을 따라 세포내 Ca^{2+} 유리 기관인 근소포체가 나란히 마주보며 배열되어 있는 구조가 있다. 이와 같이 t-tubule 내의 근막과 근소포체 막이 나란히 마주 보고 배열되어 있는 구조를 dyad라고 하고 막사이의 공간을 dyadic cleft라고 한다(Carl 등, 1995; Sun 등, 1995). Dyad 구조에서 근막에는 세포외부 Ca^{2+} 이 유입되는 이온 통로인 전압 민감성 L-type Ca^{2+} 통로(L-type Ca^{2+} channel; LTCC)가 존재하고, 근소포체 막에는 저장된 Ca^{2+} 이 세포질로 유리되는 통로인 ryanodine 수용체가 존재한다. 심장의 수축은 활동전압에 의해 LTCC가 활성화되어 세포외부의 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되면서 개시된다(Bers, 2001). LTCC 활성화에 의해 유입된 Ca^{2+} 은 인접해 있는 ryanodine 수용체를 활성화시켜 Ca^{2+} 을 근소포체로부터 세포질내로 유리한다. 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 은 actin과 결합하여 수축을 유발하게 된다. 이처럼 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 에 의해 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리하는 과정을 Ca^{2+} 유발 Ca^{2+} 유리 (Ca^{2+} -dependent Ca^{2+} -release; CICR)라 하고, 막의 전기적 활성이 심근세포의 수축을 유발하는 과정을 excitation-contraction coupling (E-C coupling)이라고 한다(Fabiato, 1983). 그러므로 t-tubule에 존재하는 dyad 구조는 심근수축기전을 이해하는데 중요한 열쇠가 된다.

수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 은 이와 같이 외부로부터 유입되는 소량의 외부 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 대량의 내부 Ca^{2+} 으로 이루어져 있다. 그러나 그 비율은 종에 따라 서로 다르다. 즉 흰쥐, 생쥐와 같은 동물에서는 외부로부터 유입되는 Ca^{2+} 이 8 ~ 10%, 내부로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 90 ~ 92%에 이르는 것으로 알려져 있다. 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. 한편 심근의 이완은 세포내 증가된 활성 Ca^{2+} 이 제거됨으로서 발생한다 (Bers 2002; Bers 등, 1996). 심근의 Ca^{2+} 항상성을 유지하기 위해 제거 과정에서도 세포외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 동일한 양의 Ca^{2+} 은 근막에 존재하는 Na^+ - Ca^{2+} exchanger (NCX)와 Ca^{2+} -ATPase에 의해 세포 밖으로 배출되고 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 과 동일한 양의 Ca^{2+} 은 근소포체의 sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase(SERCA)에 의해 재섭취 된다. 그러나 근막에 존재하는 Ca^{2+} -ATPase는 NCX에 비해 Ca^{2+} 배출 활성이 낮기 때문에 세포내 Ca^{2+} 배출은 대부분 NCX를 통해 이루어지고 있다(Bers, 2001).

NCX는 한 분자의 Ca^{2+} 이온에 대해 세 분자의 Na^+ 이온이 맞교환 하는 기전으로 세포막을 사이에 두고 Ca^{2+} 과 Na^+ 의 농도차 그리고 막전압에 따라 Ca^{2+} 의 이동 방향은 수시로 바뀌게 된다. 뿐만아니라 교환되는 이온의 전하 차이에 의해 Na^+ 이온의 이동방향으로 전류를 발생한다. 그러므로 NCX는 세포내 Ca^{2+} 을 배출 하면서 내향 NCX 전류를 발생할 수 있고 (forward mode) 또한 세포내로 Ca^{2+} 을 유입하면서 외향 NCX 전류를 발생할 수 있다 (reverse mode). 실제로 활동전압 초기에는 NCX를 통해 Ca^{2+} 이 유입되는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 심근주기 동안 NCX는 내향 전류를 발생하며 Ca^{2+} 을 배출하게 되며, 결국 심근의 가장 중요한 Ca^{2+} 배출 기전으로 작용하고 있다.

한편 NCX를 통해 유입된 소량의 외부 Ca^{2+} 이 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 마찬가지로 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리할 수 있다는 사실이 기넌픽에서 보고되었다 (Leblanc 및 Hume, 1990). NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 CICR를 유발하기 위해서

는 NCX가 dyadic cleft 내의 ryanodine 수용체와 매우 근접하게 위치해 있어야 할 것이다. 그러나 dyadic cleft 내에 NCX의 존재 여부를 추구하는 조직학적 연구 결과는 보고자마다 상반되는 결과를 보고함으로써 아직 뚜렷한 결론을 내리지 못하고 있다. 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 최근엔 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 연구 결과에서도 마찬가지이다. 초기의 기능적 연구에서 LTCC 봉쇄제를 사용하여 LTCC를 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). 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+} microdomain과 기능적으로 분리되어 있다고 보고하였다 (Adachi-Akahane 등, 1996). 선행된 기능적 연구에서 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 에 의한 CICR 기전은 대부분 NCX의 활성인 큰 기닉픽과 토끼에서 보고된 반면에 NCX가 ryanodine 수용체와 기능적으로 분리되어 있다는 보고는 대부분 NCX 활성이 적은 흰쥐에서 주로 보고되었다.

한편 최근에 심근의 NCX의 발현을 조절한 동물모델에서 NCX가 L-type Ca^{2+} 전류 (I_{CaL})의 Ca^{2+} 의존 불활성(Ca^{2+} -dependent inactivation; CDI)를 조절하고 있음이 알려졌다. 즉 심근의 NCX를 과발현(over-expression)한 마우스에서 I_{CaL} 가

증가하였고 반면에 심근의 NCX의 발현을 억제한(cardiac specific knockout) 마우스에서 I_{CaL} 가 상당량 감소(~50%)하였다 (Henderson 등, 2004; Pott 등, 2006). 이와 같이 흰쥐와 유사한 NCX 활성을 가지고 있는 마우스에서 NCX가 I_{CaL} 를 조절하기 위해서는 NCX와 LTCC가 매우 근접해 위치해 있어야 할 것이다. 심근에서 LTCC는 t-tubule 내에서도 근소포체의 유리 통로인 ryanodine 수용체가 있는 dyadic cleft 내에 집중되어 있는 것을 감안 한다면, NCX 또한 dyadic cleft 내에 존재할 가능성이 있을 것으로 추측된다.

선행된 연구를 종합해 보면 NCX는 t-tubule에 존재하지만 NCX를 포함하는 영역이 근소포체의 ryanodine 수용체와 LTCC가 포함된 dyadic cleft 안에 존재하는지 아니면 단지 NCX가 LTCC와 같은 영역에 존재하지만 ryanodine 수용체가 배제된 dyadic cleft 밖에 존재하는지에 대해 명확히 규명되지 않았다. 만약 NCX가 심근의 dyadic cleft 내에 존재하고, dyadic cleft 내에서 LTCC를 통해 세포외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 NCX에 의해 배출된다면, NCX는 심근의 수축조절에 있어 중요한 역할을 담당하게 될 것이다. 즉 dyadic cleft 내에서 NCX의 활성은 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 을 배출하여 실제 수축에 필요한 활성 Ca^{2+} 량을 감소시키게 될 것이고 결국 수축 속도와 강도에 영향을 미치게 될 것이다.

그러므로 본 연구에서는 심장의 수축 기전에서 NCX의 작용을 규명하기 위해 NCX가 dyadic cleft 내에 존재하는지를 확인하고자 하였다. 이러한 목적을 달성하기 위해 효소로 분리한 토끼와 흰쥐의 심실근 세포는 고농도의 Ca^{2+} 완충제인 BAPTA에 의해 Ca^{2+} 의 확산을 제한한 상태에서 전기 생리적 방법을 이용하여 I_{CaL} 를 발생하였고 Ca^{2+} 을 배출하면서 발생하는 내향 NCX 전류를 약리학적 방법을 이용하여 측정하였다. 또한 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로 봉쇄제인 ryanodine이 존재할 때와 존재하지 않을 때에 NCX의 내향 전류를 비교 분석하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1 단일 심실근 세포의 분리

본 실험에서는 체중 250 g 내외의 흰쥐(Sprague-Dawley rat)와 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 pentobabital 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 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 Ca^{2+} 이 제거된 Tyrode 용액을 흰쥐는 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), 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 결체조직을 분해시켰다. 효소 처치 후 0.2 mM Ca^{2+} 이 첨가된 Tyrode 용액으로 바꾸어 6 분간 관류함으로써 심근 조직 내 효소를 씻어내었다. 이 후 심실근 조직 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 10 분 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 미세조작기(TS-5000-150, Burleigh, USA)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 100 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 10 BAPTA, 125 CsCl, 3.5 CaCl_2 , 5 ATP-Mg, 20 tetraethylammonium chloride(TEA-Cl), 0.1 cAMP 이며 pH는 CsOH를 사용하여 7.2로 적정하였다. CsCl와 TEA-Cl은 K^+ 전류를 억제하기 위해 첨가하였다. 세포내 Ca^{2+} 농도는 Winmax C v2.5(stanford University, USA)를 사용하여 90 nM이 되도록 조절하였다.

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

결체조직 분해효소인 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 nimodipine는 Sigma로부터 구입하였다.

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 \pm 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

단일 세포로 분리된 흰쥐 심실근 세포는 전 세포막 고정법(whole-cell patch clamp method)를 시행하였다. 흰쥐 심실근 세포는 막전압을 -60 mV로 고정된 후 각각 -30 , -10 , 0 , $+10$, $+40$ mV로 100 ms 동안 탈분극하여 I_{CaL} 를 유발하였다. 현재 사용하는 NCX 봉쇄제는 대부분 I_{CaL} 를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Reuter 등, 2002). 그러므로 본 실험에서는 NCX를 봉쇄하기 위해 약물용액에 NCX의 기질 이온인 Na^+ 을 Li^+ 으로 대체한 Na^+ 배제용액(0Na)을 사용하였다. 0Na은 탈분극 자극 2 초 전에 처치하여 탈분극 자극이 끝날 때 까지 처치하였다. 측정된 전류는 탈분극으로 발생한 내향전류에서 10 μ M nimodipine에 의해 억제된 전류의 차로 구하였다. 실험에 사용한 단일 심실근 세포는 횡문이 뚜렷하고 가장자리가 명확한 세포만을 선정하였다. 전류의 측정은 투석용액이 세포내로 충분히 투석되도록 기다린 후 0 mV로 탈분극에 의해 발생하는 전류가 안정된 후 측정을 실시하였다.

3.1 흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 에 대한 0Na 효과

투석용액에 10 mM BAPTA의 첨가는 세포의 수축을 강력히 억제하였고 탈분극에 의해 발생한 내향전류는 10 uM nimodipine에 의해 완벽히 봉쇄되었다. 탈분극에 의해 발생한 내향전류는 -30 mV (-7.0 ± 1.8 pA/pF, -0.3 ± 0.06 pC/pF, $n=9$)에서 느리게 활성화되고 느리게 불활성되는 작은 내향전류를 발생하였다. 탈분극이 -10 mV (-27.8 ± 1.4 pA/pF, -0.9 ± 0.05 pC/pF, $n=10$), 0 mV (-27.0 ± 1.1 pA/pF, -1.0 ± 0.04 pC/pF, $n=11$)로 커짐으로서 빠르게 활성화되는 큰 내향전류를 발생하였고, 이후 탈분극이 $+10$ mV (-20.9 ± 0.8 pA/pF, -1.0 ± 0.02 pC/pF, $n=9$), $+40$ mV (-7.4 ± 0.5 pA/pF, -0.4 ± 0.03 pC/pF, $n=9$)로 커짐으로 내향전류는 감소하였다 (그림 1). 0Na은 -30 mV, -10 mV, 0 mV 그리고 $+10$ mV의 탈분극으로 발생한 내향 전류를 의미 있게 억제하였고 0Na으로 억제되는 전류와 전하유입량의 비율은 각각 -30 mV에서 53.0 ± 4.6 %, 46.1 ± 3.5 %, -10 mV에서 17.5 ± 2.4 %, 14.8 ± 0.6 %, 0 mV에서 10.0 ± 0.8 %, 8.7 ± 0.6 %, $+10$ mV에서 3.6 ± 1.0 %, 6.3 ± 0.6 % 억제하였다. 한

편 +40 mV의 탈분극 자극으로 발생한 내향 전류는 0Na에 의해 의미있게 억제되지 않았다. +40 mV의 탈분극에서 NCX의 전류는 강하게 reverse mode로 작용한다. 그러나 +40 mV에서 0Na의 효과가 사라지는 것은 본 연구의 실험조건에서 reverse mode NCX 전류가 거의 발생하지 않고 있음을 의미한다.

그림 2는 막전압의 변화에 따른 0Na의 처치 전과 처치 후의 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량의 변화를 보여주고 있다. I_{CaL} 의 최대 전류와 전하유입량은 0mV 근처에서 최대값을 보이는 종모양(bell shape)의 전형적인 I_{CaL} 의 전류-전압 곡선을 보여주고 있다. 0Na은 -30 mV에서 +10 mV에서 내향전류를 의미 있게 억제하였다. 0Na으로 억제되는 실제 전류와 실제 전하 유입량은 전압에 반비례하여 감소하였다.

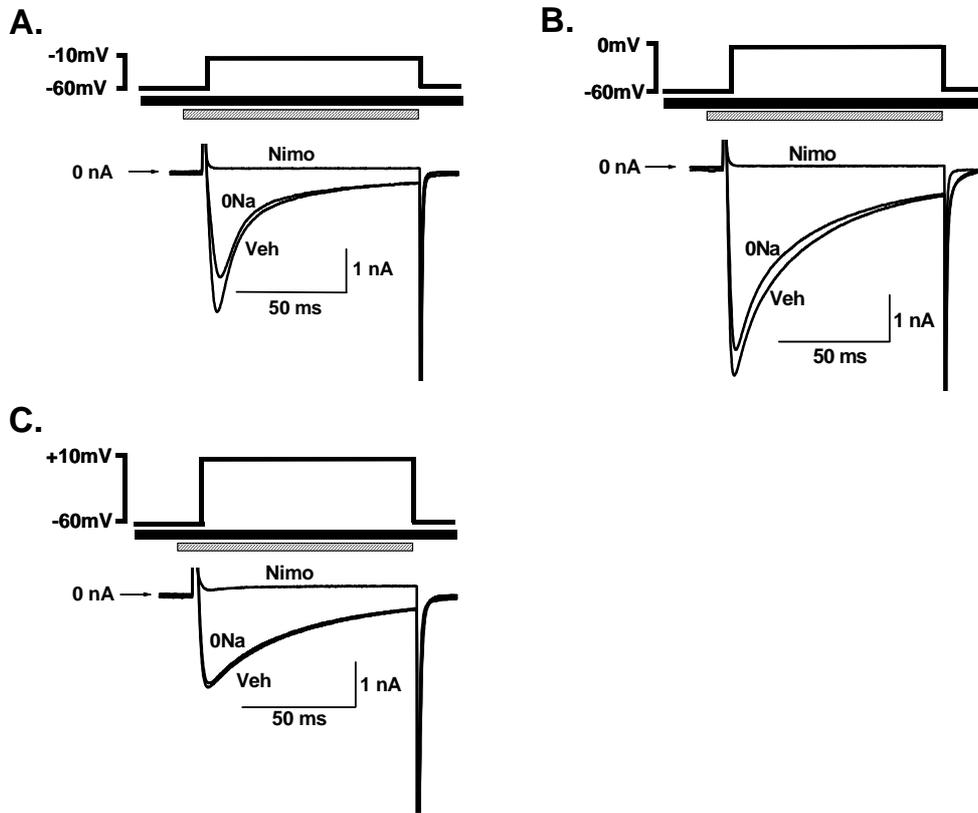


그림 1. 흰쥐 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제. 그림은 10 mM BAPTA로 투석한 흰쥐 심실근 세포를 막전압 -60 mV로 고정된 상태에서 100 ms 동안 -10mV (A), 0 mV (B), +10 mV (C)로 탈분극 함으로 발생한 실제 I_{CaL} 을 나타낸다. 0Na은 탈분극 2초 전에 처치하여 탈분극이 끝날 때 까지 처치하였다. Veh: KCl를 제거한 tyrode 용액 + 0.1 mM DIDS + 3 μM TTX, 0Na: Veh에서 NaCl을 LiCl로 대체한 용액, Nimo: 10 μM nimodipine.

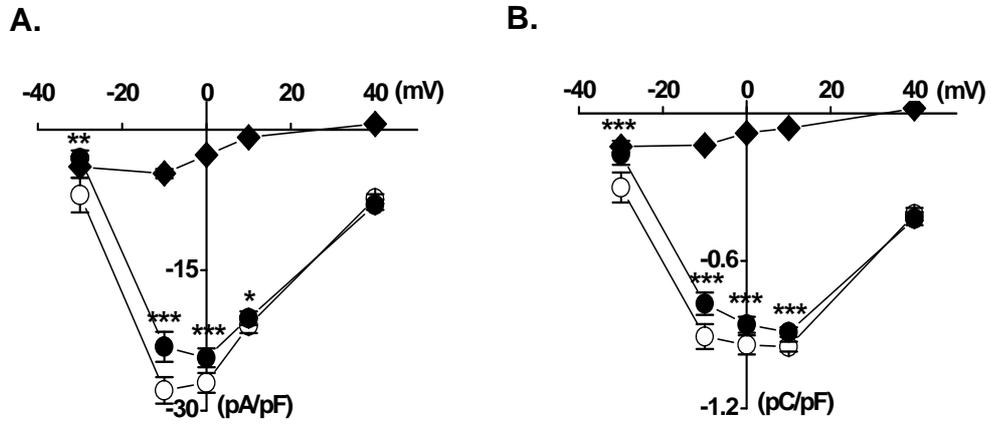


그림 2. 흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 의 전류-전압 상관관계에 대한 Na^+ 배제의 영향. A: 최대 전류, B: 전하유입량. ○: Veh, ●: 0Na, ◆: Veh과 0Na의 차. 실험 예수: -30 mV (n=9), -10 mV (n=10), 0 mV (n=11), +10 mV (n=9), +40 mV (n=9). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

3.2 근소포체 유리 Ca^{2+} 제거 후 0Na 효과

심실근 세포에서 활성 Ca^{2+} 은 세포외부로부터 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 CICR 기전에 의해 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 공급된다. 만약 10 mM BAPTA로 형성한 Ca^{2+} microdomain에 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 존재하고 있다면 0Na 으로 억제된 전류에 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 발생한 내향 전류가 포함되어 있을 것이다. 그러므로 10 mM BAPTA로 투석한 흰쥐 심실근 세포에서 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 0Na 으로 억제되는 전류에 대한 기여를 확인하기 위해 10 μM ryanodine을 투석용액에 첨가하여 근소포체의 유리 Ca^{2+} 을 봉쇄하였다.

그림 3에서 보는 바와 같이 ryanodine의 투석은 탈분극에 의해 발생한 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량을 각각 -30 mV에서 -17.9 ± 3.0 pA/pF, -0.7 ± 0.1 pC/pF, -10 mV에서 -36.7 ± 2.7 pA/pF, -1.2 ± 0.1 pC/pF, 0 mV에서 -32.5 ± 2.0 pA/pF, -1.2 ± 0.1 pC/pF, +10mV에서 -27.3 ± 1.9 pA/pF, -1.2 ± 0.1 pC/pF로 ryanodine을 투석하지 않은 군에 비해 20~30% 정도 증가시켰다. Ryanodine 투석 후 전압에 따른 전류와 전하 유입량의 변동은 종모양의 곡선을 보였지만 최대 피크 전류값은 -10 mV 근처로 이동하였다. Ryanodine 투석 후 0Na 의 처치는 여전히 -30mV ~ +10mV 범위에서 최대 전류와 전하 유입량을 의미있게 봉쇄하였고 0Na 으로 억제되는 실제 전류와 실제 전하 유입량은 전압에 반비례하여 감소하였다.(그림 4).

그림 5의 A와 B는 0Na 으로 억제되는 실제 전류와 실제 전하 유입량이 전압에 반비례하는 -10 mV ~ +10 mV 범위에서 ryanodine 처치 전과 처치 후 0Na 으로 억제되는 % 분율을 보여준다. +40 mV에서는 0Na 이 탈분극에 발생한 내향전류를 억제하지 않았기 때문에 제외하였고, 또한 -30 mV에서는 근소포체로부터 Ca^{2+} 유리가 대단히 작기 때문에 제외하였다. 비록 흰쥐 심실근 세포에서 최대 전류와 전하 유입량은 ryanodine을 처치하지 않은 군에 비해 처치 군에서 증가하였지만 0Na 으로 억제되는 최대 전류와 전하유입량의 % 분율은 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 한편 I_{CaL} 의 CDI를 나타내는 지수인 불활성의 속도상수인 시상수 역시 별다른 변동이 나타나지 않았다(그림 5 C). 이와 같은 결과는 10 mM BAPTA로 투

석한 흰쥐 심실근 세포에서 근소포체의 유리 Ca^{2+} 이 NCX를 통해서는 거의 배출이 되지 않는다는 것을 의미한다.

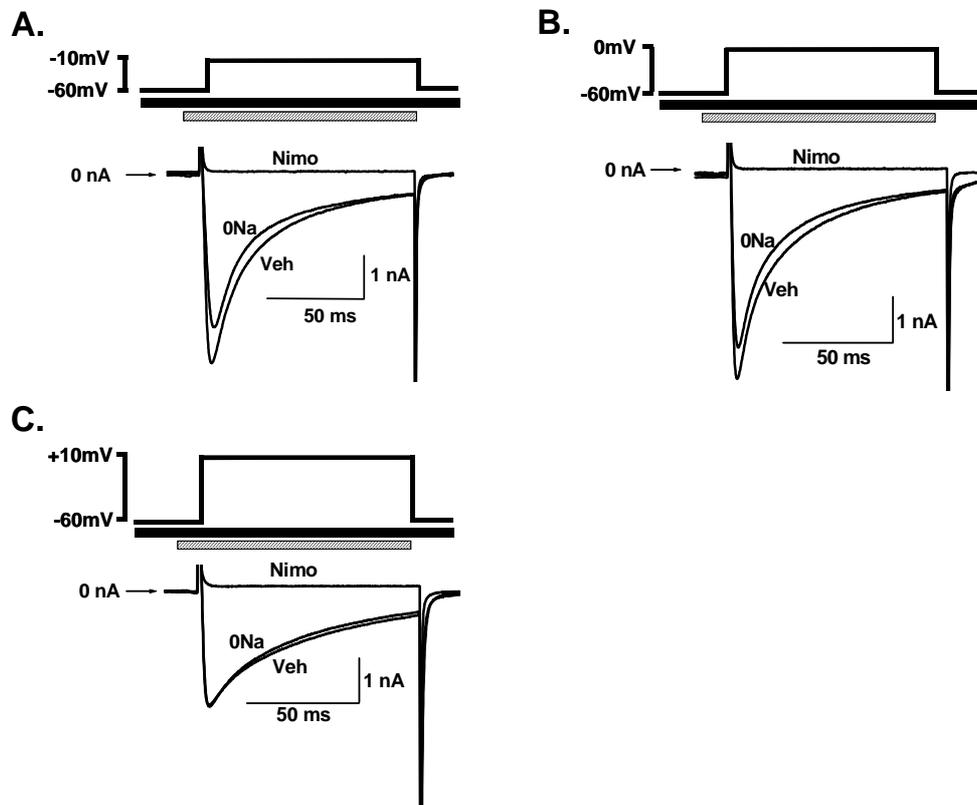


그림 3. 10 μM ryanodine 처치 한 흰쥐 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제. 투석용액에 10 μM ryanodine의 첨가 후 -10mV (A), 0 mV (B), +10 mV (C)로 탈분극 함에 따라 발생한 실제 I_{CaL} 의 변동. 0Na의 처치는 ryanodine 투석 후 전류가 평형 상태에 도달하였을 때 처치하였음. 기타 범례는 그림 1과 같음.

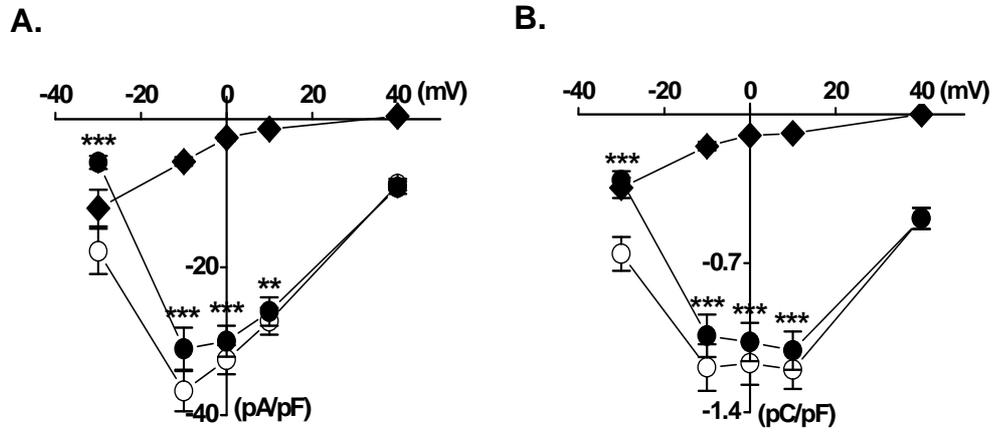


그림 4. 10 μM ryanodine을 투석한 흰쥐 심실근 세포에서 탈분극 전압에 따른 I_{CaL} 의 최대 전류 (A)와 전하유입량 (B)의 Na^+ 배제에 의한 억제. ○: Veh, ●: 0Na, ◆: Veh과 0Na의 차. 실험예수: -30 mV (n=11), -10 mV (n=11), 0 mV (n=12), +10 mV (n=11), +40 mV (n=11). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

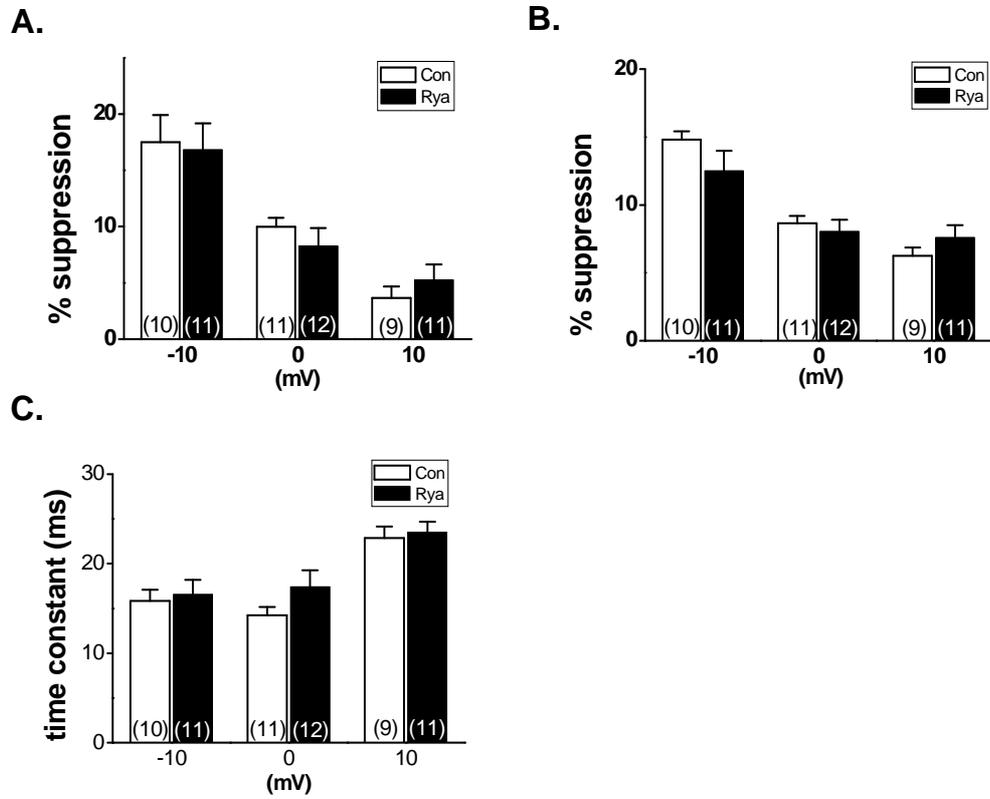


그림 5. 흰쥐 심실근 세포에서 I_{CaL} 중 $0Na$ 으로 억제되는 최대 전류 (A)와 전하 유입량 (B)의 % 분율과 시상수(C)에 미치는 $10 \mu M$ ryanodine의 영향. Con: ryanodine을 투석하지 않은 군, Rya: ryanodine을 투석한 군. ()안의 숫자는 실험 예수.

3.3 토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 에 대한 0Na 효과

토끼 심실근 세포 역시 10 mM BAPTA를 투석할 경우 후 흰쥐 심실근 세포에 서와 마찬가지로 수축이 강력히 억제되었다. 그림 6 은 BAPTA로 투석한 토끼 심 실근 세포에서 탈분극에 의해 발생한 실제 전류를 보여 주고 있다. BAPTA로 투 석한 토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량은 각각 -30 mV에서 -1.3 ± 0.2 pA/pF, -0.1 ± 0.02 pC/pF, -10 mV에서 -19.6 ± 1.6 pA/pF, -0.6 ± 0.04 pC/pF, 0 mV에서 -24.0 ± 1.7 pA/pF, -0.7 ± 0.05 pC/pF, +10 mV에서 -18.0 ± 1.7 pA/pF, -0.7 ± 0.05 pC/pF, +40mV에서 -5.8 ± 0.8 pA/pF, -0.3 ± 0.04 pC/pF를 나타내 었고 0 mV에서 최대값을 보이는 종모양의 전류, 전하 유입량-전압 곡선을 보였다 (그림 7). 0Na은 탈분극에 의해 발생한 I_{CaL} 를 억제하였고 0Na으로 억제되는 전류 와 전하유입량의 비율은 각각 -10 mV에서 41.3 ± 2.4 %, 23 ± 1.5 %, 0 mV에서 13.9 ± 0.8 %, 10.3 ± 0.5 %, +10mV에서 5.4 ± 0.8 %, 5.3 ± 0.9 % 억제하였다.

Ryanodine을 처리한 군에서도 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량은 처리하지 않은 군에 비해 약간의 증가를 보였고(그림 8), 0 mV에서 최대값을 보이는 종모양의 전류, 전하 유입량-전압 곡선을 보였다(그림 9). 하지만 0Na으로 억제되는 전류와 전하 유입량의 비율은 ryanodine 처리하지 않은 군에 비해 각각 -10 mV에서 28.3 ± 3.3 %, 18.1 ± 1.7 %, 0 mV에서 10.6 ± 1.2 %, 8.2 ± 0.6 %, +10mV에서 3.4 ± 0.9 %, 5.2 ± 0.5 %로 감소하였다.

이와 같은 감소는 BAPTA로 투석한 토끼 심실근 세포에서 0Na으로 억제되는 전류와 전하 유입량이 -10 mV ~ +10 mV 범위에서 0Na으로 억제되는 I_{CaL} 의 % 비율과 I_{CaL} 의 CDI에 대한 ryanodine의 영향을 보여주는 그림 10에서 명확하게 나 타난다. 흰쥐 심실근 세포와 달리 토끼 심실근 세포는 ryanodine 처리 후 0Na으로 억제되는 전류와 전하 유입량의 % 비율이 -10 mV와 0 mV에서 의미 있게 감소 하였고 또한 I_{CaL} 의 CDI도 ryanodine 처리에 의해 -10 mV, 0 mV 그리고 +10 mV에서 의미 있게 느려졌다. 이와 같은 결과는 10 mM BAPTA로 투석한 토끼 심실근 세포에서 근소포체 유리 Ca^{2+} 이 흰쥐에서와는 달리 여전히 I_{CaL} 의 CDI에 영향을 미치고 있으며 또한 NCX를 통해서 배출되고 있음을 의미한다.

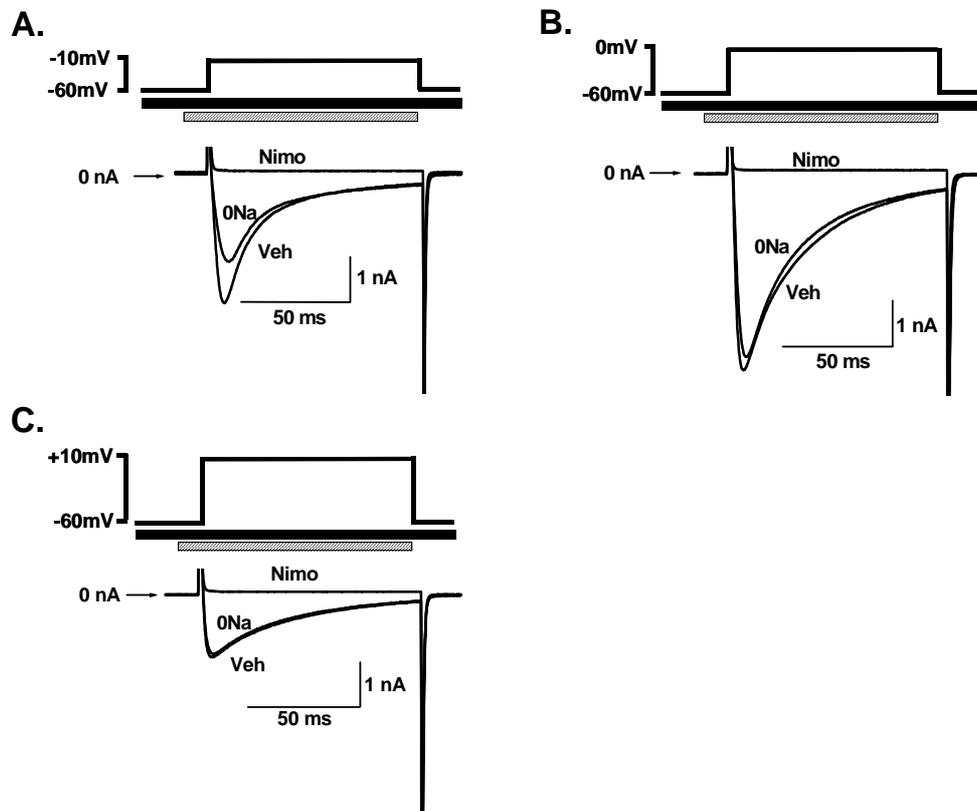


그림 6. 토끼 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제. 그림은 10 mM BAPTA로 투석한 토끼 심실근 세포에서 막전압을 -60 mV로 고정된 상태에서 100 ms 동안 -10mV (A), 0 mV (B), +10 mV (C)로 탈분극에 의해 발생한 I_{CaL} 을 나타낸다. 0Na은 탈분극 2초 전에 처치하여 탈분극이 끝날 때 까지 처치하였다. 기타 범례는 그림 1과 같음.

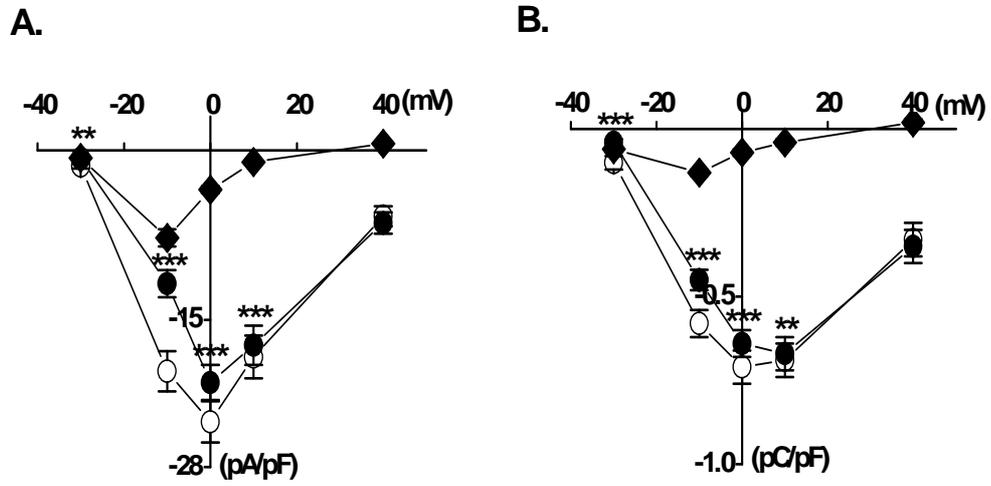


그림 7. 토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 의 전류-전압 상관관계에 대한 Na^+ 배제의 영향. A: 최대 전류, B: 전하유입량. ○: Veh, ●: 0Na, ◆: Veh과 0Na의 차. 실험 예수: -30 mV (n=9), -10 mV (n=11), 0 mV (n=11), +10 mV (n=9), +40 mV (n=8). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

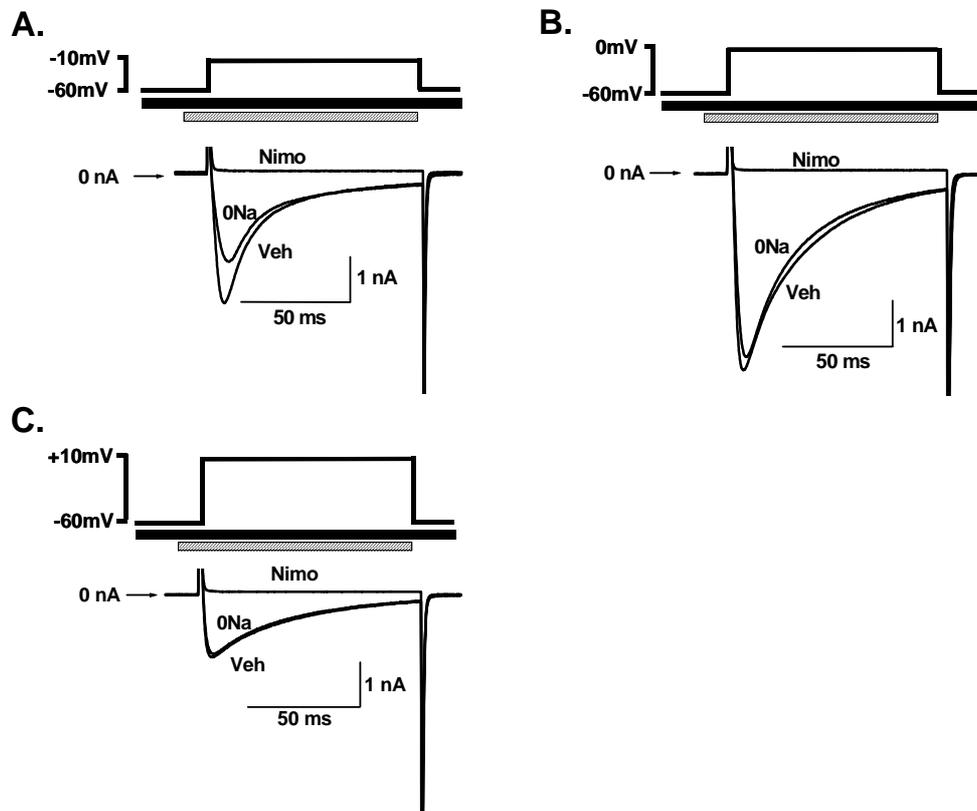


그림 8. 10 μM ryanodine 처치 한 토끼 심실근 세포에서 Na^+ 배제에 의한 I_{CaL} 의 억제. 투석용액에 10 μM ryanodine의 첨가 후 -10mV (A), 0 mV (B), +10 mV (C)로 탈분극 함에 따라 발생한 실제 I_{CaL} 의 변동. 0Na의 처치는 ryanodine 투석 후 전류가 평형 상태에 도달하였을 때 처치하였음. 기타 범례는 그림 1과 같음.

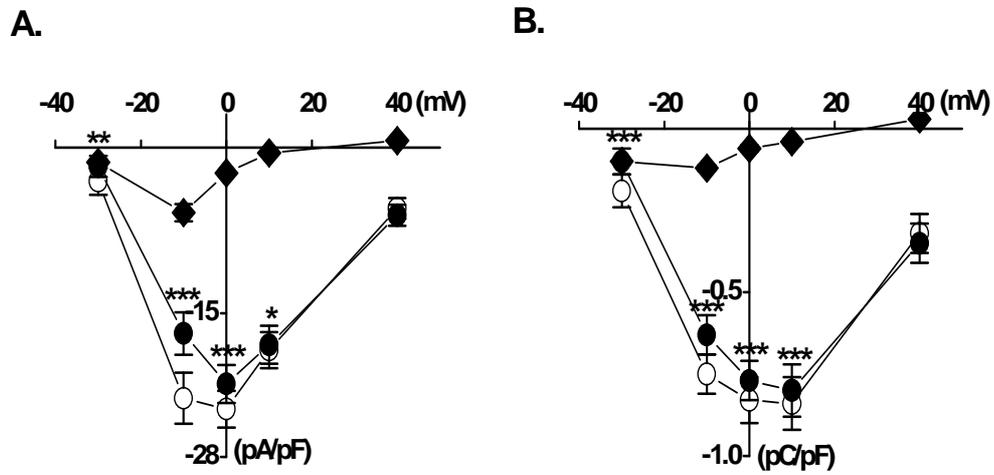


그림 9. 10 μM ryanodine을 투석한 토끼 심실근 세포에서 탈분극 전압에 따른 I_{CaL} 의 최대 전류 (A)와 전하유입량 (B)의 Na^+ 배제에 의한 억제. ○: Veh, ●: 0Na, ◆: Veh과 0Na의 차. 실험예수: -30 mV (n=9), -10 mV (n=9), 0 mV (n=10), +10 mV (n=7), +40 mV (n=6). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

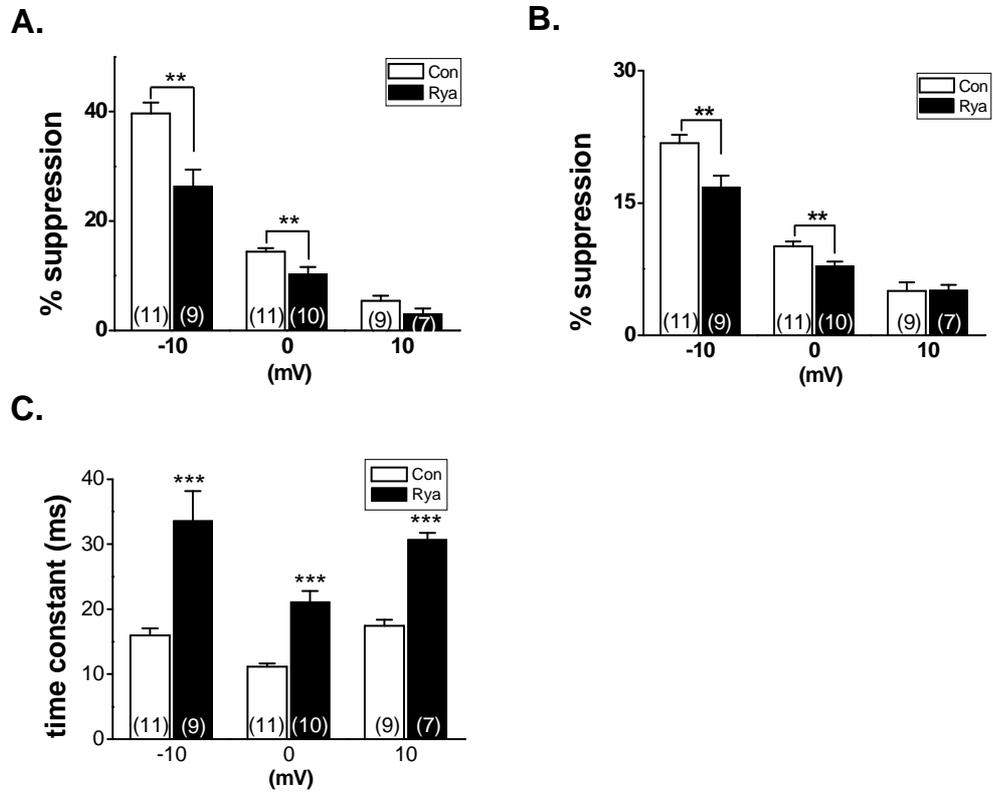


그림 10. 토끼 심실근 세포에서 I_{CaL} 중 $0Na$ 로 억제되는 최대 전류 (A)와 전하 유입량 (B)의 % 분율과 시상수(C)에 미치는 $10 \mu M$ ryanodine의 영향. Con: ryanodine을 투석하지 않은 군, Rya: ryanodine을 투석한 군. ()안의 숫자는 실험예수. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

3.4 근소포체의 ryanodine 수용체와 NCX의 상호작용

흰쥐와 토끼의 차이를 좀더 명확히 확인하기 위하여 10 mM caffeine로 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 NCX에 의해 배출되면서 발생하게 되는 내향 NCX 전류가 10 mM BAPTA 투석후의 변동을 흰쥐와 토끼에서 각각 비교하여 보았다. 흥미롭게도 그림 11에서 보는바와 같이 흰쥐 심실근세포의 경우에는 caffeine 처리로 인한 내향 NCX 전류가 BAPTA에 의해 사라지는 반면에 토끼 심실근세포의 경우에는 BAPTA 투석 후에도 내향 NCX 전류가 잘 보존되었다. 이와 같은 결과는 흰쥐 심실근세포에서 10 mM BAPTA에 의해 형성된 Ca^{2+} microdomain에 ryanodine 수용체가 배제되어 있음을 의미하고 반면에 토끼의 경우에는 10 mM BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain에 ryanodine 수용체가 포함되어 있음을 의미한다.

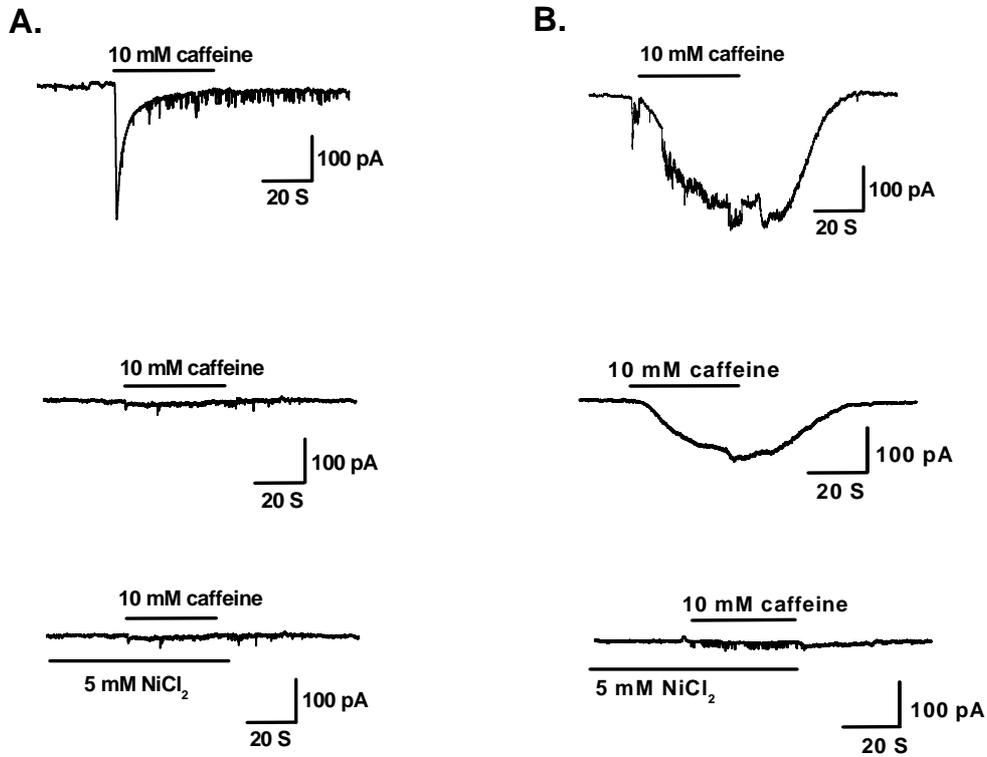


그림 11. 근세포체 유리 Ca^{2+} 으로 발생한 내향 NCX 전류에 BAPTA가 미치는 영향. 흰쥐 (A)와 토끼 (B) 심실근 세포에서 -80 mV 로 막전압을 고정한 후 20 초 동안 10 mM caffeine 처치에 의해 BAPTA가 존재하지 않을 때 발생한 실제 내향 NCX 전류 (위)와 BAPTA가 존재할 때 발생한 실제 내향 NCX 전류 (중간) 그리고 NiCl_2 에 의해 봉쇄되는 내향 NCX 전류 (아래).

제4장 고찰

NCX는 세포막을 경계로 세포안과 밖의 Ca^{2+} 농도와 Na^+ 농도차 그리고 막전압에 따라 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 배출할 수도 있고 세포 안으로 유입할 수도 있다. 다시 말해 세포안의 Ca^{2+} 농도가 높고 막전압이 안정막 전압에 가까울수록 NCX는 세포내 Ca^{2+} 을 세포 밖으로 배출하는 반면에 세포내 Na^+ 농도가 높고 막전압이 크게 탈분극 되었을 때에는 세포외부로부터 Ca^{2+} 을 세포 안으로 유입한다 (Bers, 2001). 그러므로 NCX가 심근에서 주요한 이완 기전 외에 수축기전에도 관여할 수 있다. 실제로 NCX는 심근의 활동 전압 초기에 세포 밖으로부터 Ca^{2+} 을 세포내로 이동시키는 것으로 알려져 있으며 일부 기능적 연구에서 NCX를 통한 Ca^{2+} 유입이 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리시킬 수 있는 가능성도 제시하였다 (Leblanc 및 Hume, 1990). 하지만 NCX를 통한 Ca^{2+} 유입이 근소포체로부터 CICR 기전을 일으킬 수 있는 가능성은 일부 종에서만 재현되었을 뿐 다른 종에서는 확인하지 못하였다 (Adachi-Akahane 등, 1996). 종에 따라 NCX의 활성이 근소포체로부터 CICR를 발생할 가능성의 차이는 결국 심근의 전기흥분-수축 연결 (excitation-contraction coupling; E-C coupling)과 관련되어 있는 단백질의 조직학적 분포에 기인할 가능성이 매우 크다. 그러므로 본 연구의 목적은 고농도의 Ca^{2+} 완충액에 의해 형성된 Ca^{2+} microdomain 안에서 E-C coupling과 관련된 단백질을 약리학적 방법을 이용하여 변동시켰을 때 NCX의 활성의 변화를 측정하여 종에 따른 차이를 구별하고자 하였다.

현재까지 NCX만을 선택적으로 봉쇄하는 봉쇄제는 존재하지 않는다. 알려진 봉쇄제 또한 낮은 농도에서 다른 이온 통로와 이온 수송체를 봉쇄하는 것으로 보고되었다 (Reuter 등, 2002). 그러므로 본 연구에서는 NCX의 기질 이온인 Na^+ 을 배제한 용액(0Na)을 이용하여 NCX를 봉쇄하였고 또한 NCX의 reverse mode를 방지하기 위해 세포 투석용액에 Na^+ 대신 Cs^+ 으로 대체하였으며 전압 민감성 Na^+ 통로를 봉쇄하기 위해 약물 용액에 3 μM TTX를 첨가하였다. 고농도의 Ca^{2+} 완충

제를 투석한 심실근 세포에서 0Na은 -30mV에서 +10 mV까지 탈분극에 의해 발생한 I_{CaL} 를 의미 있게 봉쇄하였다. 0Na에 의해 억제되는 전류는 탈분극 자극이 커질수록 감소하는 전형적인 전류-전압 곡선을 발생하였으며 +10 mV 이상의 탈분극 자극에서 의미 있는 외향 전류를 발생하지 않았다. 이것은 본 연구의 실험 조건에서 NCX의 reverse mode에 의한 간섭이 상당량 제거되었음을 의미한다.

한편 심근의 활성 Ca^{2+} 은 종에 따라 세포외로부터 LTCC를 통해 10 ~ 30% 공급되고 세포 내부의 근소포체로부터 ryanodine 수용체를 통해 70 ~ 90%가 공급된다 (Bers 2002; Bers 등, 1996). 결국 NCX를 통한 Ca^{2+} 의 배출은 세포 외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 세포내부로부터 유리된 Ca^{2+} 을 배출하게 될 것이다. 그러므로 본 연구에서 고농도의 Ca^{2+} 완충제로 투석한 심실근 세포에서 0Na으로 억제되는 전류는 세포외부로부터 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 이 NCX를 통해 배출되면서 발생한 내향 NCX 전류가 될 것이다.

BAPTA로 투석한 흰쥐 심실근 세포와 토끼 심실근 세포에서 0Na은 탈분극 자극에 의해 발생한 I_{CaL} 의 최대 전류와 전하 유입량 모두를 의미 있게 억제하였다. 0Na으로 억제된 실제 전류는 전압과 반비례하며 감소하는 전류-전압곡선을 보였다. 이와 같은 결과는 NCX가 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain에 존재하고 있음을 의미한다. 10 mM BAPTA는 Ca^{2+} 의 확산을 5 ~ 7nm로 제한하는 것으로 알려져 있다 (Stern, 1992; Sham, 1997; Adachi-Akahane 등, 1996). 따라서 10 mM BAPTA로 형성되는 Ca^{2+} microdomain은 LTCC 활성화에 의해 형성되는 근막 아래의 좁은 범위로 제한된다. 결과적으로 BAPTA 존재하에서 0Na에 의한 NCX의 봉쇄는 이러한 제한된 Ca^{2+} microdomain 안에서 일어나는 반응이고 NCX가 LTCC와 매우 근접하여 존재하고 있음을 의미하게 된다. 이와 같은 결과는 심근의 NCX가 I_{CaL} 의 CDI를 조절하고 있다는 보고와 일치하는 결과이다 (Henderson 등, 2004; Pott 등, 2006).

하지만 BAPTA 존재하에서 10 μ M ryanodine의 세포내 투석으로 근소포체 유

리 Ca^{2+} 을 봉쇄할 경우 0Na 은 흰쥐 심실근 세포와 토끼 심실근 세포에서 뚜렷한 차이를 보였다. 흰쥐 심실근 세포에서는 $10\ \mu\text{M}$ ryanodine을 처리하여도 0Na 으로 억제되는 전류와 전하 유입량의 % 분율이 변동되지 않는 반면에 토끼 심실근 세포에서는 $-10\ \text{mV}$, $0\ \text{mV}$ 에서 의미 있게 억제되었다. 이것은 흰쥐의 경우 BAPTA로 형성된 기능적 Ca^{2+} microdomain 안에 NCX가 LTCC와 매우 근접하여 위치해 있는 반면에 ryanodine 수용체는 배제 되어 있고, 토끼에서는 BAPTA로 형성된 기능적 Ca^{2+} microdomain 안에 NCX가 LTCC와 매우 근접하여 위치해 있으며 또한 ryanodine 수용체도 포함되어 있음을 의미한다.

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 근소포체의 ryanodine 수용체를 포함하는 기능적 Ca^{2+} microdomain으로부터 배제되어 있다고 결론을 내렸다(Adachi-Akahane 등, 1996). 이번 연구에서도 caffeine 처리로 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리한 후 발생하는 내향 NCX 전류는 $10\ \text{mM}$ BAPTA에 의해 흰쥐 심실근세포에서 완전히 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 토끼 심실근세포에서는 잘 보존되어 있었다. 이와 같은 결과는 흰쥐의 경우에는 이전의 연구 결과와 마찬가지로 NCX가 근소포체의 Ca^{2+} 유리 통로인 ryanodine 수용체와 기능적으로 분리되어 있음을 재확인하며, 반면에 토끼에서는 NCX와 ryanodine 수용체가 기능적으로 같은 Ca^{2+} micro-domain안에 존재하고 있음을 의미하게 된다.

심근에서 I_{CaL} 는 LTCC 주위의 Ca^{2+} 농도의 증가에 의해 불활성 된다. I_{CaL} 의 CDI은 심근의 Ca^{2+} 과충전을 방지하는 negative feedback mechanism으로 알려져 있다 (Isenberg, 1977; Kass 및 Sanguinetti, 1984; Lee 등, 1985). 한편 심장에서 LTCC의 대부분은 t-tubule 내에 집중되어 있고 또한 ryanodine 수용체와 마주 하여 배열된 구조인 dyad에 상당량이 존재하고 있다(Takagishi 등, 2000; Carl 등, 1995; Kawai 등, 1999; Musa 등, 2002; Scriven 등, 2000; Doly 등, 1986; Frank 등, 1992) 그러므로 심근에서 CDI는 상당량의 활성 Ca^{2+} 을 공급하는 근소포체로부

터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 크게 영향을 받는 것은 당연할 것이다. 실제 I_{CaL} 의 CDI는 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 에 의해 65 ~ 75%에 달하는 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Adachi-Akahane 등, 1996).

본 연구에서 고농도의 빠른 Ca^{2+} 완충제인 BAPTA로 투석한 흰쥐 심실근 세포는 시상수 값이 근소포체의 Ca^{2+} 유리 단백질인 ryanodine 수용체를 봉쇄하는 10 μ M ryanodine에 의해 의미 있는 변화를 유발하지 못하였다. 반면에 고농도의 BAPTA 투석한 토끼 심실근세포는 -10 mV에서 16.0 ± 1.1 ms, 0 mV에서 11.2 ± 0.5 ms, +10 mV에서 17.4 ± 0.9 ms의 시상수 값이 세포내 ryanodine 투석에 의해 BAPTA가 존재함에도 불구하고 -10 mV에서 33.6 ± 1.6 ms, 0 mV에서 21.1 ± 1.7 ms, +10 mV에서 30.7 ± 1.0 ms로 의미 있게 느려졌다. 토끼 심실근 세포에서 ryanodine의 투석으로 I_{CaL} 의 CDI가 감소하는 결과는 BAPTA에 의해 형성된 Ca^{2+} microdomain이 dyadic cleft를 포함하고 있음을 명확하게 대변해 주는 것이다.

조직 면역학 방법을 이용한 측정으로부터 심근의 dyad 구조는 폭이 약 100 ~ 200 nm이고 dyad의 두 막간 거리는 12 ~ 15 nm으로 보고되었다(Soeller 및 Cannell, 1999; Sun 등, 1995; Franzini-Armstrong 등, 1999, Langer 및 Peskoff, 1996). 또한 활성화된 LTCC로 유입된 Ca^{2+} 의 확산은 BAPTA에 의해 5 ~ 7nm로 제한하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 흰쥐 심실근 세포에서도 또한 dyad 구조 안에 BAPTA에 의한 Ca^{2+} microdomain이 존재하고 있을 것이다. 결과적으로 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain에서 ryanodine 처치에 의해 I_{CaL} 의 CDI 감소 효과와 NCX 활성의 변화의 결과는 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain을 dyadic cleft 안과 dyadic cleft 밖으로 구분할 수 있다. 즉 흰쥐의 경우 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain은 ryanodine 수용체와 LTCC가 포함된 영역(dyadic cleft 안)과 LTCC와 NCX가 포함된 영역(dyadic cleft 밖)으로 구분되며 토끼의 경우 ryanodine 수용체와 LTCC 그리고 NCX를 포함하는 영역(dyadic cleft 안)과 LTCC와 NCX가 포함되는 영역(dyadic cleft 밖)으로 구분할 수 있다 (그림 12).

이전의 연구는 NCX를 통해 유입된 Ca^{2+} 이 CICR 기전에 의해 근소포체로부터 Ca^{2+} 을 유리할 수 있음을 제시하였지만 실제 NCX와 ryanodine 수용체가 dyadic

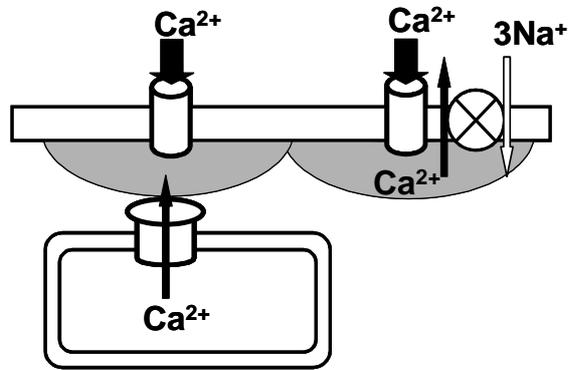
cleft 내에 존재하고 있는지는 제시하지 못하였다 (Leblanc 및 Hume, 1990). 본 연구는 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain에 ryanodine 수용체의 존재 여부를 확인함으로써 NCX를 통한 Ca^{2+} 유입이 왜 CICR를 일으키는지를 명확히 증명하였다. 더군다나 토끼의 NCX 활성은 흰쥐에 비해 약 3배 정도 높기 때문에 NCX를 통해 유입되는 Ca^{2+} 은 흰쥐에 비해 더욱 높을 것이다 (Bers 2002; Bers 등, 1996). 그러므로 선행된 연구에서 보고된 두 종의 차이는 결국 dyadic cleft 내에 NCX의 존재와 NCX의 활성의 차이에 기인하였을 것으로 추측된다.

한편 생리적 환경에서 NCX은 심근주기 동안 대부분 세포내 Ca^{2+} 을 배출하면서 주로 심근의 이완 기전으로 작용한다(Bers, 2002; Adachi-Akahane 등 1997; Terracciano 등, 1988; Yao 등, 1998). 그러나 이번 연구는 종에 따라 NCX가 심근의 이완 기전 외에도 수축의 강도를 조절할 수 있을 가능성을 보여주고 있다. 즉 토끼의 경우 NCX가 dyadic cleft 내에 존재함으로써 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체의 유리 Ca^{2+} 이 수축을 유발하기 전에 NCX를 통해 배출될 가능성을 보여주고 있다. Dyadic cleft 내에서 NCX 활성 변화는 결국 수축 강도와 수축속도에 영향을 미치게 될 것이다. 반면에 흰쥐의 경우 NCX는 대부분 dyadic cleft 밖에 존재함으로써 수축보다는 이완 기전에 더 많은 영향을 미치게 될 것이다. 그러므로 E-C coupling에서 NCX의 발현과 활성의 변화는 종에 따라 수축과 이완에 다르게 영향을 미칠 것으로 추측된다. 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).

본 연구는 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain에서 흰쥐의 경우 NCX가 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 을 배출하고 반면에 토끼의 경우 LTCC를 통해 유입된 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 유리된 Ca^{2+} 을 동시에 배출하고 있음을 확인하였다. 그러므로 이 결과로부터 LTCC와 ryanodine 수용체에 의해 형성되는 기능적 Ca^{2+} microdomain에 NCX가 배제되어 있는 흰쥐 심근과는 달리 토끼 심근에서는 NCX를 위시한 3 가지 구조가 동일한 기능적 Ca^{2+} microdomain 내에 공존하고 있다고

결론 내려진다.

A.



B.

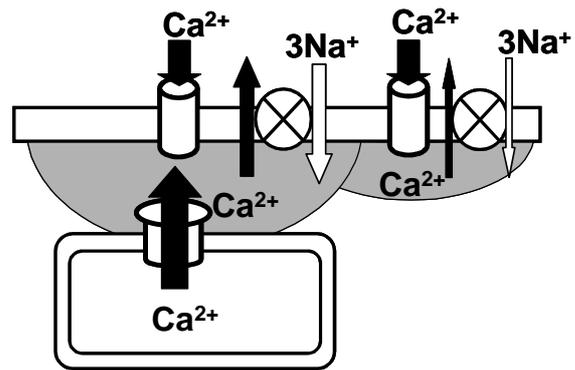


그림 12. 현쥐 (A)와 토끼 (B) 심실근 세포에서 BAPTA로 형성되는 기능적 Ca^{2+} microdomain의 예상되는 모식도.

제5장 결 론

본 연구는 10 mM BAPTA로 형성된 Ca^{2+} micro-domain에서 탈분극 자극에 의해 발생한 L-type Ca^{2+} 전류에서 ryanodine 처치 전과 처치 후 0Na으로 억제되는 전류를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 10 mM BAPTA 존재하에서 토끼와 흰쥐 심실근 세포는 0Na에 의해 탈분극 자극으로 발생한 L-type Ca^{2+} 전류를 의미 있게 억제되었다.

2. 10 uM ryanodine을 투석한 흰쥐 심실근 세포에서도 0Na은 L-type Ca^{2+} 전류와 전하 유입량을 의미 있게 억제하였다. 하지만 ryanodine은 L-type Ca^{2+} 전류의 CDI를 느리게 하지 못하였고 0Na으로 억제되는 전류와 전하 유입량의 % 분율을 의미 있게 감소시키지 못하였다.

3. 반면에 토끼 심실근 세포는 ryanodine 투석에 의해 0Na으로 억제되는 전류와 전하 유입량을 의미 있게 감소시켰으며 또한 L-type Ca^{2+} 전류의 CDI를 의미 있게 느리게 하였다.

4. -80 mV로 막전압을 고정된 상태에서 10 mM caffeine은 토끼 심실근세포에서 내향 NCX 전류를 발생한 반면에 흰쥐 심실근 세포에서는 내향 NCX 전류를 발생하지 못하였다.

이상의 실험결과로 보아 BAPTA로 형성된 Ca^{2+} microdomain안에 NCX는 흰쥐의 경우 ryanodine 수용체가 배제된 L-type Ca^{2+} 통로와 같은 microdomain안에 존재하며 토끼의 경우 NCX는 ryanodine 수용체와 L-type Ca^{2+} 통로가 같은 microdomain에 존재하고 있음을 확인하였다.

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

Kieval RS, Bloch RJ, Lindenmayer GE, Ambesi A, Lederer WJ. Immunofluorescence localization of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in heart cells. Am J Physiol Cell Physiol 1992; 263: C545-550.

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.

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 Ca²⁺ Handling Proteins in Rabbit Sinoatrial Node. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 311-324.

Pott C, Yip M, Goldhaber JJ, Philipson KD. Regulation of Cardiac L-Type Ca²⁺ Current in Na⁺-Ca²⁺ Knockout Mice: Functional Coupling of the Ca²⁺ Channel and the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *Biophys. J.* 2006: biophysj.106.091538.

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.

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.

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.

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

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.

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

Yang Z, Pascarel C, Steele DS, Komukai K, Brette F, Orchard CH. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchanger on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transients in Murine Ventricular Myocytes. *Circ Res* 1998; 82: 657-665.

ABSTRACT

Species-Related Distribution of $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ Exchange in the Dyadic Cleft in the Heart

Jin Ho

Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

$\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange contributes as the major Ca^{2+} extrusion mechanism in the heart. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange is Na^+ and Ca^{2+} antiporter activated by differences in the Na^+ and Ca^{2+} concentrations across the sarcolemma. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange brings Ca^{2+} into the cell particularly during early phase of action potential according to the changes in the intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations and the membrane potential in the heart. It has been reported that the Ca^{2+} brought into the cell by the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange also triggers Ca^{2+} release from the SR as like the Ca^{2+} from the L-type Ca^{2+} channel in the heart. This phenomenon requires presence of $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange in the dyadic cleft where ryanodine receptor, the Ca^{2+} release channel of the SR, concentrate. However, histological results are still under debate without any conclusions due to limitations in the resolution of modern photo-electronic technology. Situation is the same in the functional perspectives: The phenomenon is well identified in the species such as rabbit and guinea-pig, in which $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange extrudes relatively larger amount of Ca^{2+} from cell (20 ~ 30 % of total activator Ca^{2+}). While it is still obscure in the species such as rat and mouse, in which $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange extrudes only 8 ~ 10 % of total activator Ca^{2+} from cell. In an effort to pursue whether the Ca^{2+} brought into the cell by the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange also triggers Ca^{2+} release from the SR, therefore, this study was aimed to clarify the reason for this species-related difference by comparing between rat

and rabbit hearts whether $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange collocalizes with ryanodine receptor in the functional Ca^{2+} microdomain produced by high BAPTA. The results were as follows.

1. Na^+ removal suppressed I_{CaL} activated by depolarization ranged from -30 mV to $+40$ mV in an inversely proportional manner to voltage eliciting no suppressions at $+40$ mV in the both ventricular myocytes from rat and rabbitinternally dialyzed with 10 mM BAPTA.
2. 10 μM ryanodine pretreatment significantly reduced the I_{CaL} suppressions after Na^+ removal in the rabbit ventricular myocytes but not in the rat ventricular myocytes.
3. 10 mM caffeine produced inward I_{NCX} even in the presence of 10 mM BAPTA in the rabbit ventricular myocytes but not in the rat ventricular myocytes.

From these results, it is concluded that $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange is excluded from the Ca^{2+} microdomain containing L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor in the rat heart, while all three are collocated in the same Ca^{2+} microdomain in the rabbit heart.

Keyword: $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange, L-type Ca^{2+} channel, Ryanoidne receptor, BAPTA