

Kanamycin이 토끼 단일 심근 세포막의 Ca^{2+} Current에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실
안덕선 · 박국인 · 강복순

= Abstract =

Effect of Kanamycin on Calcium Current of Rabbit Ventricular Myocyte

Ahn Duck Sun, M.D., Park Kook In, M.D., Kang Bok Soon, M.D.

Department of Physiology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

It has been reported that kanamycin, a useful agent in the treatment of gram-negative and other infectious disease, has a negative inotropic action in isolated cardiac muscle preparation and also it decreases the amplitude of high K^+ -induced action potential of guinea pig atrium. These findings imply that kanamycin has a property of Ca^{2+} antagonist.

In this study, the effects of kanamycin on cardiac Ca^{2+} current were investigated in isolated rabbit ventricular cells by using a whole cell clamp method.

The results are summarized as follows :

- 1) Kanamycin caused a depression of cardiac Ca^{2+} current in a dose dependent manner and its effect was observed in a whole membrane potential range.
- 2) The decreasing effect of kanamycin on Ca^{2+} current was inhibited by high Ca^{2+} -Tyrode solution and such inhibition was also observed in high Sr^{2+} -Tyrode solution, but in the case of Cd^{2+} , well known inorganic Ca^{2+} antagonist, the current through Ca^{2+} channel was greatly decreased when the perfusate was changed from high Ca^{2+} -Tyrode to high Sr^{2+} -Tyrode solution.
- 3) In the presence of kanamycin, the decreasing pattern of Ca^{2+} current by repetitive depolarization was not specific as in the case of verapamil.
- 4) Neomycin decreased Ca^{2+} current similar to kanamycin.

From the above results, it may be concluded that kanamycin has competitive antagonistic effect on cardiac Ca^{2+} current.

KEY WORDS : Kanamycin · Rabbit ventricular cell · Ca^{2+} current · Ca^{2+} antagonist.

서 론

Ca^{2+} channel을 통한 세포 내로의 Ca^{2+} 유입이 여러 다양한 세포들의 정상 생리 작용에 중요한 역할을 하고 있음은 잘 알려져 있다¹⁰⁾. 즉 막전압의

탈분극시 나타나는 세포 내로의 Ca^{2+} 의 유입(gated Ca^{2+} flux, Ca^{2+} inward current)은 신경세포의 synaptic transmission에 필수적인 역할을 하며, 골격근에서는 excitation-contraction coupling에 밀접히 연관되어 있다²⁵⁾. 심근세포에서도 역시 Ca^{2+} current는

활동전압의 발생 및 유지, 심근 세포의 excitation-contraction coupling, 그리고 자율신경 전달물질(autonomic neurotransmitter)의 효과 발현 등에 필수적인 역할을 하고 있으며^{6,21,22)}, 이같은 Ca^{2+} current의 크기, 즉 Ca^{2+} channel의 활성도는 여러가지 신경호르몬(neurohormone)이나 약물 등에 의해 조절 되고 있다²⁰⁾.

이같은 중요성에도 불구하고 심근세포의 Ca^{2+} 전류의 성상에 대한 연구는 최근까지도 많은 어려움을 겪어왔다. 즉 심근은 복잡한 다세포 조직 구조를 갖고 있어서 이의 막전압을 고정하여 Ca^{2+} current를 측정하고자 하는 경우 막전압이 균일하게 고정되지않아 측정된 Ca^{2+} current가 실제 막을 통한 Ca^{2+} current를 정확히 반영하지 못하였으며, 세포 사이의 직렬 저항 및 좁은 세포 간격에 축적되는 이온들의 영향 역시 Ca^{2+} current의 변형을 초래하여 Ca^{2+} current의 성상 연구에 많은 어려움을 초래하였다. 또한 Ca^{2+} 외의 다른 이온에 의한 전류, 특히 K^{+} current가 함께 기록됨으로 인해 Ca^{2+} current의 성상을 규명하고 그에 미치는 여러 약물의 작용기전을 규명하는데 있어서 어려움이 많았었다^{13,16,18)}. 최근 개발된 단일 심근 세포를 이용한 whole cell clamp 방법은 막전압을 균일하게 고정할수 있을 뿐만 아니라⁹⁾ 세포내의 이온 조성을 내부 관류 방법에 의해 조절함으로써^{13,14)}, 여러가지 종류의 막전류 중에서 순수하게 Ca^{2+} current만을 분리, 측정할수 있게 되어 Ca^{2+} current에 대한 연구에 커다란 진보를 이룩하게 되었다.

임상에서 감염성 질환의 치료제로 사용되고 있는 aminoglycoside 계통의 항생제 중의 하나인 kanamycin은 신장 및 청각 계통에 대한 독성 이외에 순환기계에도 장애를 초래함이 보고되었다^{19,23)}. 즉 kanamycin은 그의 투여 농도에 비례하여 심근의 수축력을 저하시키고⁵⁾, 분리한 심근막에서의 Ca^{2+} 결합을 경쟁적으로 억제하며¹²⁾, 고농도 K^{+} -유발 활동전압의 크기 및 탈분극 속도를 저하시킨다는 보고¹⁾등으로 미루어 보아 kanamycin이 calcium 길항제적 효과를 갖고 있음을 추측할 수 있었다. 따라서 본실험에서는 단일 심근 세포를 이용한 막전압 고정법을 통해 1) kanamycin이 Ca^{2+} current의 크기 및 그의 kinetics에 미치는 영향을 관찰하고, 2) 외부 Ca^{2+} 농도 변화가 kanamycin의 효과에 미치는 영향을 관찰하고 이를 기존의 Ca^{2+} antagonist의 효과와 비교해 봄으로써

kanamycin에 의한 심근 수축력 저하의 기전을 규명해 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 단일 심근 세포의 제작

실험 동물은 체중 1.5~2kg의 토끼를 암수 구별없이 사용하였다. Pentobarbital sodium(60mg/kg) 과 heparin(2000IU/kg)을 토끼의 귀정맥 내에 주사하여 마취시킨후 경동맥을 절단하여 피를 제거한 다음 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 100% 산소로 포화시킨 정상 Tyrode 용액에 담근 상태에서 대동맥 기시부에 관을 삽입하여 정상 Tyrode 용액이 관상 혈관을 통해 심근 조직으로 관류되도록 하였으며, 이때의 관류 압력은 65cm H_2O 로, 심장 주위의 온도는 37°C로 유지하였다.

정상 Tyrode 용액으로 약 10분간 관류하여 조직 속의 혈액을 제거한 후 calcium을 제거한 Tyrode 용액으로 약 6분간 관류하여 세포외액의 Ca^{2+} 을 세척하여 주었다. 이후 50 μM Ca^{2+} 과 collagenase(Sigma type 1A) 0.04%가 포함된 Tyrode 용액으로 약 15분간 관류시켜 심장의 결체 조직을 digestion시켜 주었다. 관류액을 저장 용액(Kraft-Bürhe, KB medium)으로 바꾸어 10분간 관류시키면서 심장 조직 속에 남아있는 여분의 collagenase를 제거한 후 심실근 조직만을 분리하여 사용하였다. 심실근 조직 절편을 저장용액에 담근 상태로 잘 흔들어 주어 심근 세포들이 조직 절편으로 부터 분리되도록 하였으며, 이같은 방법으로 얻은 심근 세포를 4°C에서 약 2시간 보관한 후 실험에 사용하였다.

2. 실험 용액의 조성

3. Whole cell clamp 방법

Inverted microscope(Olympus) 위에 설치한 실험 chamber 내에 심근세포 부유액을 한, 두 방울 떨어뜨린 후 약 5~10분간 기다려서 심근 세포가 chamber 바닥에 고정되도록 하였다. 이후 정상 Tyrode 용액을 2~3ml/min의 속도로 관류시키면서 실험을 실시하였다. 직경이 2~3 μm 되는 유리 미세 전극을 심근 세포에 근접시킨 후 전극 내부에 음압(-10cm H_2O)을 가하여 giga seal을 형성하였다⁷⁾. 이때 giga seal의 형성 여부는 +2mV 크기의 구형파를 1초 간격으로

정상 Tyrode 용액	NaCl(140), KCl(5.4), CaCl ₂ (1.8), MgCl ₂ (1.0), HEPES(5), NaH ₂ PO ₄ (0.3), Glucose (5.5) mM. pH adjusted to 7.4 with NaOH
저장 용액 (KB medium)	KCl(40), KH ₂ PO ₄ (20), Glutamate(50), Taurine(20), MgCl ₂ (3), Glucose(10), HEPES (10), EGTA(5) mM. pH adjusted to 7.4 with KOH
전극내 용액	CsCl(120), Cs ₂ EGTA(10), MgCl ₂ (5), HEPES(10), Tris-ATP(5) pH adjusted to 7.4 with CsOH
외부 관류 용액	정상 Tyrode 용액의 조성 중 KCl을 TEA-Cl로 치환하여 사용하였다.

전극내에 주입하면서 그에 따른 전류 발생을 oscilloscope으로 관찰하여 판정하였다. 일단 giga seal이 형성되게 되면 전극 내부의 음압을 -40~-50cm H₂O 까지 증가시켜 세포막을 터트리거나 혹은 강한 전기충격을 세포막에 가하여 세포막을 파열시켜 whole cell mode를 만들어 실험을 실시하였다. 심근 세포의 막전압을 patch clamp amplifier(Axopatch-1C)를 이용하여 원하는 값으로 다양하게 고정된 상태에서 탈분극 혹은 과분극 pulse를 주입하여 그에 따른 막전

류를 측정하였다. 이때 실험 목적에 따라 전극내 용액의 조성을 달리하여 원하는 종류의 전류만이 기록되도록 할 수 있는데, 본 실험에서는 Ca²⁺ 전류만을 기록하기 위해 전극내 용액으로 CsCl 용액을 사용하여 CsCl 용액이 세포 내부를 관류하도록 하여 K⁺ 전류를 차단시켜 주었다. 막전압 고정에 사용되는 자극(command pulse) 및 그에 따른 막전류의 기록은 computer program(pClamp, Axon Instrument)을 사용하여 hard disk에 직접 기록한 후 분석하였다(Fig. 2).

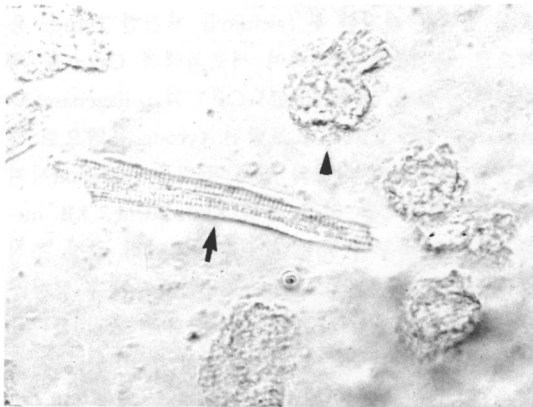


Fig. 1. 토끼 단일 심실근 세포의 전형적인 현미경 사진
정상 Tyrode 용액으로 관류시 막대 모양의 세포의 경계가 명확하고 striation이 잘 유지된 심실근 세포(화살표)와 그 주위에 손상된 구형의 심근세포(화살표 머리)들을 관찰할 수 있다(배율 400×).

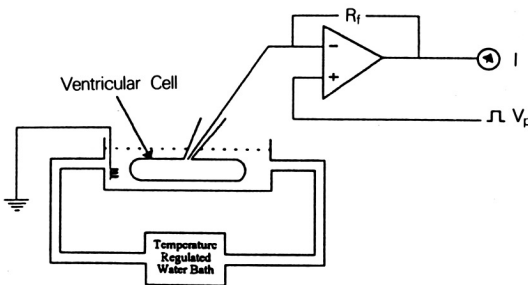


Fig. 2. 실험 장치의 모식도.

결 과

1. Kanamycin이 Ca²⁺ current에 미치는 영향

토끼 단일 심근 세포를 분리한 후 세포의 경계가 명확하고 striation이 잘 유지된 심실근 세포(Fig. 1)를 선정하여 patch clamp 방법으로 Ca²⁺ current를 측정된 결과를 Fig. 3에 표시하였다. 이때 심실근 세포 내부를 CsCl이 포함된 전극내 용액으로 관류시킴으로써 탈분극 자극시 나타날 수 있는 외향성 K⁺ 전류를 제거하였고, 막전압을 -40mV에 고정하여 Na⁺ current를 비활성화시킴으로써 Ca²⁺ current만이 주로 기록되도록 하였다¹⁵⁾.

Whole cell mode 형성후 막전압을 -40mV로 고정된 상태에서 300ms 동안 +10mV의 탈분극 pulse를 0.1Hz의 빈도로 주입하면서 그때 나타나는 Ca²⁺ 전류의 크기 변화를 기록하였다. 탈분극 pulse에 의해 나타나는 Ca²⁺ current의 크기가 일정해진 후 관류액에 kanamycin을 첨가하여 그의 효과를 관찰하였다(Fig. 3-C). Kanamycin 첨가에 의해 Ca²⁺ current의 peak amplitude가 크게 감소하였으며(Fig. 3-A), 이 같은 감소 효과는 관류액의 kanamycin 농도 증가시 더욱 현저하게 나타났다(Fig. 3-B). 이후 관류액을 정상 Tyrode 용액으로 교환한 경우 kanamycin에 의해 감소되었던 Ca²⁺ current의 크기가 거의 정상으로

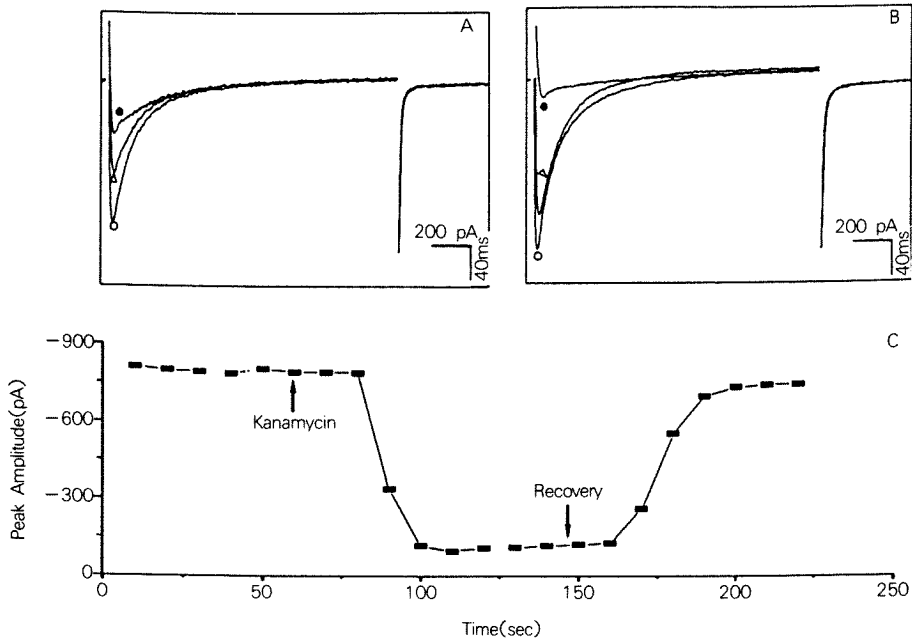


Fig. 3. Kanamycin이 Ca²⁺ current에 미치는 효과.

토끼 심실근 세포의 막전압을 -40mV로 고정된 상태에서 300ms 동안 +10mV의 탈분극 pulse를 0.1Hz의 빈도로 주입하면서 그때 나타나는 Ca²⁺ 전류의 활성 변화를 기록하여 이를 대조군으로 삼았다(○). 탈분극 pulse에 의해 나타나는 Ca²⁺ 전류의 크기가 일정해진 후 관류액에 kanamycin 5mg%(A, ●) 및 10mg%(B, ●)를 각각 첨가하여 그의 효과를 관찰하였다. 이후 관류액을 정상 Tyrode 용액으로 교환하여 Ca²⁺ current의 크기가 회복되는 것을 관찰하였다(△). 이같은 kanamycin에 의한 Ca²⁺ 전류 감소 및 회복 양상의 시간적 경과를 그림 C에 표시하였다.

회복되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

탈분극 자극(depolarizing pulse)의 크기를 -30 mV에서 +40mV까지 10mV 간격으로 변화시켜 가면서, 그때 활성화되는 Ca²⁺ current의 크기에 미치는 kanamycin(5mg%)의 효과를 관찰하여 이를 전류-전압 곡선(IV curve) 상에 표시하였다(Fig. 4-D). Kanamycin 첨가시 모든 voltage 범위에서 Ca²⁺ current의 크기가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이후 관류액을 정상 Tyrode 용액으로 교환한 경우 Ca²⁺ current의 크기 등이 다시 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

이같은 kanamycin에 의한 Ca²⁺ 전류 억제 효과가 aminoglycoside 계통의 항생제에서 관찰되는 일반적인 현상인지 혹은 kanamycin만의 특이한 효과인지를 알아보기 위해 aminoglycoside 계통의 항생제 중의 하나인 neomycin이 Ca²⁺ 전류에 미치는 효과를 관찰하였다. Neomycin(10mg%)이 포함된 정상 Tyrode 용액으로 심근 세포를 관류시키면서 +10mV의 탈분극 pulse를 매 10초마다 주입시 나타나는 Ca²⁺ cur-

rent를 측정된 결과 kanamycin의 경우와 유사하게 Ca²⁺ current의 peak amplitude가 대조군에 비해 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

2. 외부 divalent cation이 kanamycin의 효과에 미치는 영향

Kanamycin에 의한 Ca²⁺ current 감소효과가 외부 Ca²⁺ 농도에 의해 영향을 받는지를 알아보기 위해 관류액의 Ca²⁺ 농도를 2mM에서 20mM로 증가시킨 상태에서 kanamycin의 효과를 관찰하였다(Fig. 6-A, B).

관류액의 Ca²⁺ 농도를 20mM로 증가시킨 경우, Ca²⁺ current의 peak amplitude는 외부 Ca²⁺ 농도가 2mM인 경우에 비해 현저히 증가하였으나 Ca²⁺ current의 비활성화는 더욱 빨리 일어나는 것을 볼 수 있었다(Table 1). 외부 용액의 Ca²⁺ 농도가 2mM인 경우, kanamycin에 의해 Ca²⁺ current의 크기가 현저하게 억제되었으나 외부 Ca²⁺ 농도를 20mM로 증가시킨 경우 kanamycin에 의한 Ca²⁺ current 억제

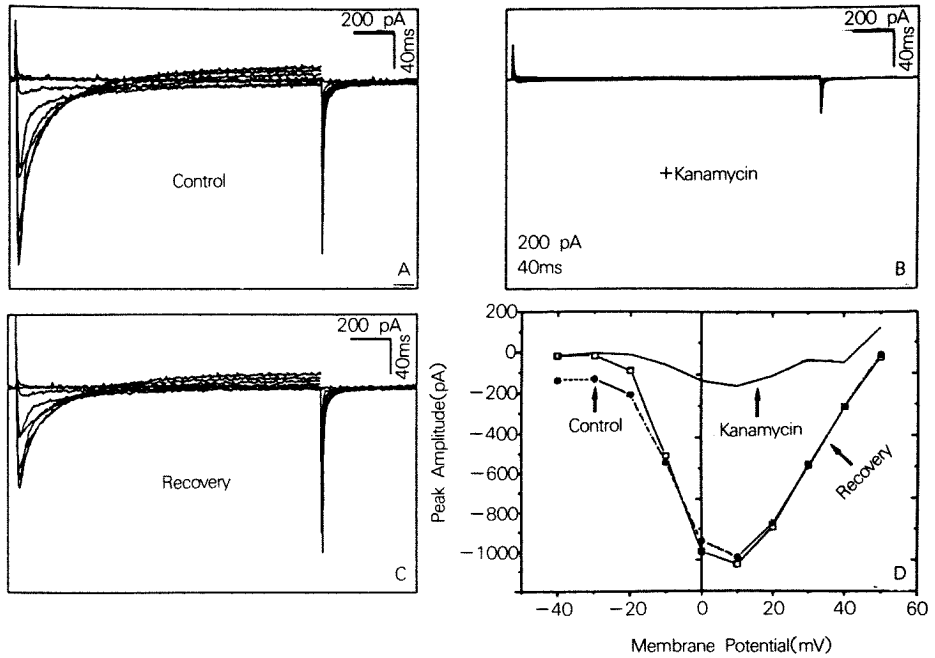


Fig. 4. Kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류-전압 곡선의 변화.

토끼 심실근 세포의 막전압을 -40mV 로 고정된 상태에서 탈분극 pulse의 크기를 -30mV 에서 $+40\text{mV}$ 까지 10mV 간격으로 변화시켜가면서, 그때 활성화되는 Ca^{2+} 전류를 기록하여 이를 대조군으로 삼았다(A). 동일한 방법으로 심근 세포를 자극하면서 관류액에 kanamycin($5\text{mg}\%$)을 첨가하여 Ca^{2+} 전류에 미치는 kanamycin의 효과를 관찰한 후(B), kanamycin이 없는 정상 Tyrode 용액으로 심근 세포를 재관류시키면서 Ca^{2+} 전류의 회복을 관찰하였다(C). 이때 각각의 탈분극 자극시 나타나는 Ca^{2+} 전류의 peak amplitude와 탈분극 pulse의 크기 사이의 상관관계를 관찰하여 이를 전류-전압 곡선(I-V curve) 상에 표시하였다(D).

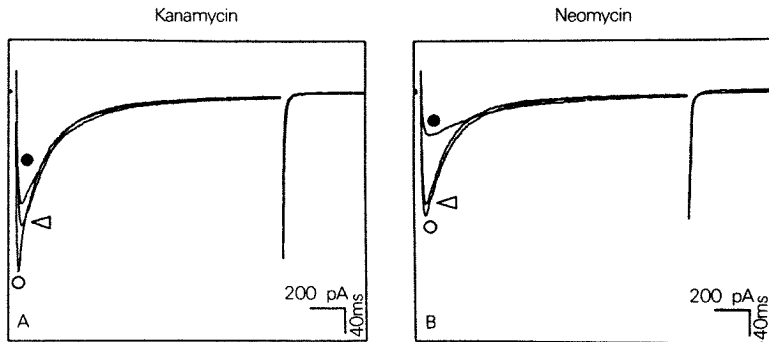


Fig. 5. Neomycin이 Ca^{2+} 전류에 미치는 영향.

토끼 심근 세포의 막전압을 -40mV 로 고정된 상태에서 10초에 한번씩 $+10\text{mV}$ 의 탈분극 pulse를 심근 세포에 주입하여, 그때 활성화되는 Ca^{2+} current의 크기에 미치는 kanamycin $10\text{mg}\%$ (A) 및 neomycin $10\text{mg}\%$ (B)의 효과를 관찰하였다(\circ : control, \bullet : kanamycin(A), neomycin(B), \triangle : recovery).

효과를 거의 관찰할 수 없었다. 이같은 외부 Ca^{2+} 에 의한 방해 현상은 기존의 Ca^{2+} 길항제(organic & inorganic Ca^{2+} antagonists)에서도 역시 보고되었다¹⁴⁾.

이같은 외부 Ca^{2+} 에 의한 방해 효과가 kanamycin과 Ca^{2+} 이 동일한 binding site에 서로 경쟁적으로 결합하여 나타나는지를 알아보기 위해 관류액의 Ca^{2+} 을

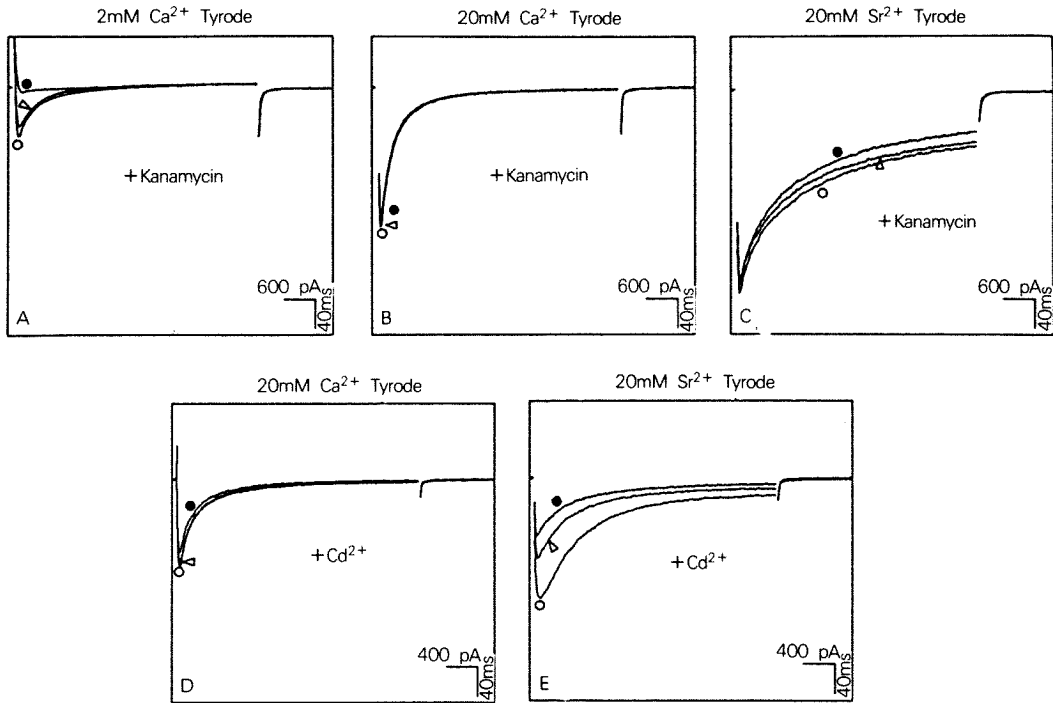


Fig. 6. 외부 2가 양이온이 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 감소에 미치는 영향.

- A : 토끼 심근 세포의 막전압을 -40mV 로 고정한 상태에서 $+10\text{mV}$ 의 탈분극 pulse를 10초에 한번씩 자극하면서 그때 나타나는 Ca^{2+} 전류에 미치는 kanamycin의 효과를 관찰하였다. 이때 외부 관류 용액으로는 정상 Tyrode(2mM Ca^{2+})용액을 사용하였다(\circ : control, \bullet : kanamycin $10\text{mg}\%$, \triangle : recovery).
- B : Ca^{2+} 농도를 20mM 로 증가시킨 modified Tyrode 용액으로 심근 세포를 관류시키면서 A와 동일한 방법으로 Ca^{2+} 전류에 미치는 kanamycin의 효과를 관찰하였다(\circ : control, \bullet : kanamycin $10\text{mg}\%$, \triangle : recovery).
- C : 외부 관류 용액의 Ca^{2+} 을 20mM Sr^{2+} 으로 대체한 후 같은 방법으로 kanamycin이 Ca^{2+} channel을 통한 Sr^{2+} 전류에 미치는 영향을 관찰하였다(\circ : control, \bullet : kanamycin $10\text{mg}\%$, \triangle : recovery).
- D : B와 동일한 상태에서 Cd^{2+} (0.05mM)이 Ca^{2+} 전류에 미치는 영향을 관찰하였다. (\circ : control, \bullet : cadmium 0.05mM , \triangle : recovery).
- E : C와 동일한 상태에서 Cd^{2+} (0.05mM)이 Ca^{2+} channel을 통한 Sr^{2+} 전류에 미치는 영향을 관찰하였다(\circ : control, \bullet : cadmium 0.05mM , \triangle : recovery).

Sr^{2+} 으로 대체하여 kanamycin의 효과를 관찰하였다. 20mM Sr^{2+} -Tyrode 용액으로 관류시킨 경우 Ca^{2+} channel을 통한 current의 peak amplitude가 크게 증가하였으며, 그의 비활성화 역시 현저히 지연되었다 (Table 1). 이때 관류액에 kanamycin을 첨가하여 그 효과를 살펴본 결과 kanamycin의 Ca^{2+} channel을 통한 current 감소 효과가 20mM Ca^{2+} -Tyrode 용액을 사용한 경우와 차이가 없었다 (Fig. 6-B, C). 비교의 목적으로 Ca^{2+} binding site에 Ca^{2+} 과 서로 경쟁적으로 결합하여 Ca^{2+} current를 감소시켜 주는 cadmium(Cd^{2+})^{11,15)}을 사용하여 그의 효과를 관찰하였

다. 20mM Ca^{2+} -Tyrode 용액으로 관류시킨 경우 Cd^{2+} 에 의한 Ca^{2+} current 감소 효과는 미약하였으나 (Fig. 6-D), 20mM Sr^{2+} -Tyrode 용액으로 관류시킨 경우에는 Cd^{2+} 에 의한 current 억제 효과가 뚜렷한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6-E).

3. 자극 방법에 따른 kanamycin의 효과

Kanamycin에 의한 Ca^{2+} current 감소 효과가 기존의 organic Ca^{2+} antagonists (verapamil 등)의 경우와 동일하게 막전압의 탈분극 정도에 따라 변화하는 지를 (Use dependency)^{22,24)} 알아보기 위해 자극 방법을

Table 1. 관류액의 Ca^{2+} 농도 변화 등에 따른 Ca^{2+} 전류의 비활성화 시정수(inactivation time constant)의 변화

Time constant	2mM Ca^{2+} -Tyrode	20mM Ca^{2+} -Tyrode	20mM Sr^{2+} -Tyrode
τ_1	*19.00 ± 1.14ms	12.42 ± 0.38ms	14.15 ± 0.38ms
τ_2	83.12 ± 2.70ms	20.29 ± 0.79ms	122.45 ± 2.18ms

*Mean ± S.E.(n=6)

† 막전압을 -40mV로 고정된 상태에서 +10mV의 탈분극 pulse를 가하여 얻은 전류의 비활성화 시정수를 분석하였다.

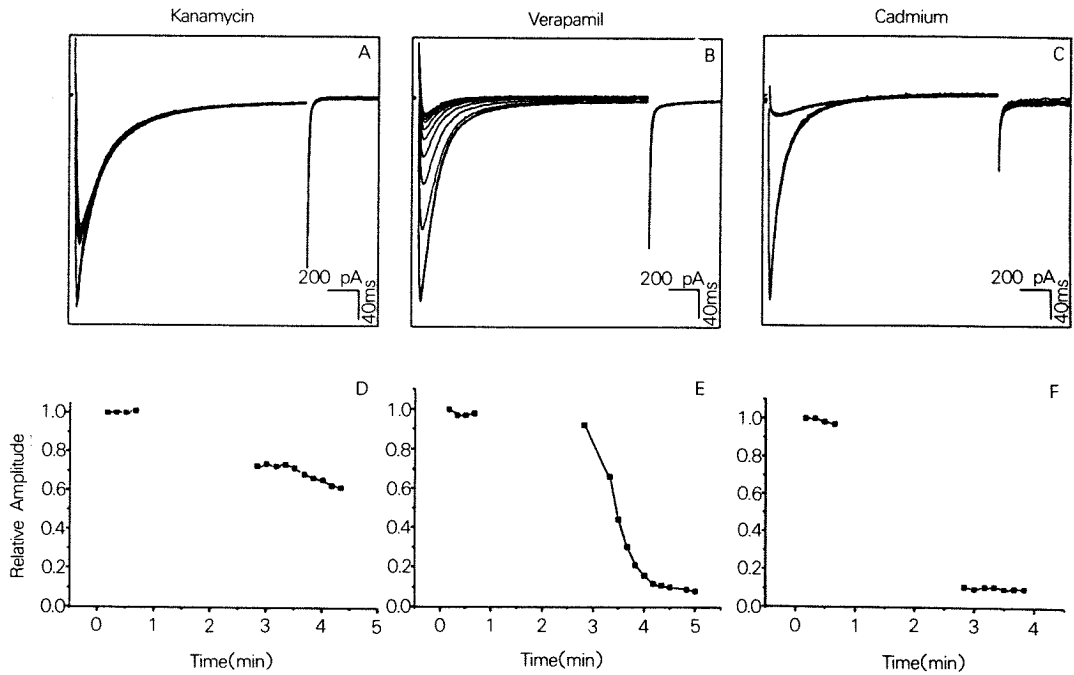


Fig. 7. 반복 자극이 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 감소에 미치는 영향.

토끼 심근 세포의 막전압을 -40mV로 고정된 상태에서 10초에 한번씩 +10mV의 탈분극 pulse를 심근 세포에 주입하여 Ca^{2+} 전류를 기록하였다. 이후 자극을 중단한 상태에서 kanamycin 10mg%(A), verapamil 10^{-6} M(B), cadmium 0.05mM(C)을 각각 관류액에 첨가하여 관류시켜 주었다. 자극 중단 2분 후에 다시 자극을 재가하여 Ca^{2+} 전류의 크기에 미치는 kanamycin(A), verapamil(B), cadmium(C)의 효과를 관찰하였다. 자극 재가 후 나타나는 Ca^{2+} 전류의 크기 변화는 drug 투여전의 Ca^{2+} 전류의 크기에 대한 백분율로 표시하였다(D, E, F).

달리하여 kanamycin의 효과를 측정하였다.

즉 토끼 심실근 세포의 막전압을 -40mV로 고정된 상태에서 10초에 한번씩 +10mV의 탈분극 pulse로 자극하여 Ca^{2+} current를 기록하여 이를 대조군으로 삼은 후, 자극을 중단한 상태에서 kanamycin, verapamil, cadmium을 각각 관류액에 첨가하여 관류시켜 주었다. 자극 중단 2분 후에 다시 자극을 재가하면서 Ca^{2+} current의 변화를 기록하여 kanamycin에 의한 Ca^{2+} current 감소 효과가 “use dependency”를 보이는지를 관찰하였다(Fig. 7).

관류액에 verapamil을 첨가하여 관류시킨 경우 자극을 하지않은 동안에는 verapamil에 의한 Ca^{2+} current의 감소 정도가 매우 미약하였으나 자극을 재가하여 반복 자극함에 따라 점차적으로 Ca^{2+} current 감소 효과가 증가하였다(Fig. 7-B, E). 반면에 Cd^{2+} 의 경우 자극을 중단한 동안에 이미 Cd^{2+} 에 의한 Ca^{2+} current 감소 효과가 충분히 발현된 것을 관찰할 수 있었다. 즉 자극 중단 후의 첫 저분극 자극에 의한 Ca^{2+} current의 크기가 대조군에 비해 현저히 감소되어 있었으며 이후의 반복 자극에 의해서도 그 크

기가 거의 변화하지 않았다(Fig. 7-C, F).

Kanamycin의 경우 verapamil과 Cd^{2+} 의 중간 정도의 효과를 보이고 있었다. 즉 자극 중단 후의 첫 저분극 자극시 나타나는 Ca^{2+} current의 크기가 대조군에 비해 비교적 감소되어 있었으며, 이후의 반복 자극에 의해서 Ca^{2+} current의 크기가 점차 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 7-A, D).

고 안

Kanamycin이 그의 투여 농도에 비례하여 심근의 수축력을 저하시키고⁵⁾, 분리한 심근막에서의 Ca^{2+} 결합을 경쟁적으로 억제하며¹²⁾, 고농도 K^+ -유발 활동전압의 크기 및 탈분극 속도를 저하시킨다는 보고¹⁾ 등은 kanamycin이 calcium 전류에 대해 길항제적 효과를 갖고 있음을 추측케 한다. 따라서 본 실험에서는 막전압 고정법을 통해 kanamycin이 Ca^{2+} current에 미치는 영향을 직접 측정하여 kanamycin이 Ca^{2+} 길항제적 성상을 갖고 있는지를 알아보려고 하였다.

토끼 심근세포의 막전압을 -40mV 로 고정하여 Na^+ 전류를 불활성화시킨 상태에서 $+10\text{mV}$ 의 탈분극 pulse에 의해 활성화되는 Ca^{2+} 전류는 과거 다세포 심근 조직에서 측정된 Ca^{2+} 전류보다 그 크기가 증가하였으며, peak amplitude까지 도달하는데 걸리는 시간(activation time)도 빨라졌다(Fig. 3). 이같은 결과는 다세포 심근조직에서 Ca^{2+} 전류를 측정하고자 막전압 고정법을 사용하는 경우 세포와 세포사이의 간격에 의해 발생하는 직렬저항 성분이 전류 측정에 장애로 작용하여 Ca^{2+} 전류의 속도 및 크기가 감소하게 되나, 단일 심근 세포를 사용하는 경우에는 이같은 직렬 저항 성분이 제거되어서 나타난 결과라고 생각된다^{9,24)}.

탈분극 pulse에 의해 발생한 Ca^{2+} 전류의 크기가 일정해진 후 관류액에 kanamycin을 첨가하여 그 효과를 살펴본 결과 토끼 심근 세포의 Ca^{2+} 전류의 크기가 kanamycin에 의해 용량 의존적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-A, B). 이같은 kanamycin의 Ca^{2+} 전류 억제 효과가 막전압의 크기에 따라 변화하는지를 알아보기 위해 탈분극 pulse의 크기를 -30mV 부터 $+40\text{mV}$ 까지 10mV 간격으로 증가시키면서 각각의 탈분극 pulse에 의해 발생하는 Ca^{2+} 전류의 크기에 미치는 kanamycin의 효과를 관찰하였다.

Kanamycin 투여시 사용한 모든 막전압 범위에서 Ca^{2+} 전류의 크기가 현저히 억제되었으며, 이때 Ca^{2+} 전류가 활성화되는 막전압(activation potential)이나 Ca^{2+} 전류의 크기가 최대로 나타나는 막전압에는 별 변화가 없었다(Fig. 3-D). 이같은 결과는 kanamycin이 Ca^{2+} 전류에 대해 길항제적 작용을 갖고 있음을 시사해 준다. 또한 aminoglycoside 계통의 항생제 중의 하나인 neomycin에 의해서도 Ca^{2+} 전류가 억제되는 것으로 보아(Fig. 5) 이같은 kanamycin의 Ca^{2+} 길항적 효과는 kanamycin만의 특이한 효과가 아니라 aminoglycoside 계통의 항생제에서 관찰되는 일반적인 현상임을 알 수 있었다¹⁹⁾. 따라서 이같은 kanamycin의 Ca^{2+} 전류 억제 효과를 기존의 Ca^{2+} 길항제와 비교, 관찰함으로써 aminoglycoside 계통 항생제의 Ca^{2+} 전류 억제 기전을 규명하고자 하였다.

Kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 감소 효과가 외부 관류액의 조성, 즉 charge carrier의 종류나 농도에 의해 영향을 받는지를 우선 관찰하고자 하였다. 외부 관류액의 Ca^{2+} 농도를 2mM 에서 20mM 로 증가시킨 상태에서 관류액에 kanamycin을 첨가한 경우, 2mM Ca^{2+} -Tyrode 용액을 관류액으로 사용한 경우와는 달리 Ca^{2+} 전류의 억제 효과가 매우 미약하였다(Fig. 6-A, B). 이같은 외부 Ca^{2+} 농도 증가시 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 감소효과가 억제되는 현상과 kanamycin이 분리한 심근막에서의 Ca^{2+} 결합을 경쟁적으로 억제한다는 보고¹²⁾ 등은 kanamycin의 Ca^{2+} 전류 억제 기전이 Ca^{2+} 의 세포 내로의 이동을 kanamycin이 경쟁적으로 억제하여 나타난 것임을 시사한다. 이같은 가능성을 규명해보기 위해 관류액의 charge carrier를 20mM Ca^{2+} 에서 20mM Sr^{2+} , 즉 Ca^{2+} channel의 internal binding site에 Ca^{2+} 이온에 비해 미약하게 결합한다고 알려진 Sr^{2+} 을 charge carrier로 사용하여 kanamycin의 효과를 관찰하였다. 대조군에서 Ca^{2+} channel을 통한 Sr^{2+} current의 peak amplitude는 charge carrier로 Ca^{2+} 을 사용한 경우에 비해 현저히 증가하였으며, 그의 비활성화 역시 현저히 지연되었다^{4, 10)}(Fig. 6-B, C, Table 1). 이때 관류액에 kanamycin을 첨가한 경우 Ca^{2+} channel을 통한 Sr^{2+} current의 억제 정도는 charge carrier로 20mM Ca^{2+} -Tyrode 용액을 사용한 경우와 유사하게 아주 미미하였다(Fig. 5-B, C). 반면에 Ca^{2+} channel의 internal site에 강하게 결합하여서 Ca^{2+} 이온이 이동하는 것을 억제한다고

알려진 cadmium(Cd^{2+})의 경우^{11,15)}, 관류액의 charge carrier로 20mM Ca^{2+} 을 사용한 경우에 비해 20 mM- Sr^{2+} -Tyrode 용액으로 심근 세포를 관류시킨 경우에는 Cd^{2+} 에 의해 current의 크기가 현저히 억제되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6-D, E). 이같은 결과는 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 억제 기전이 기존의 inorganic Ca^{2+} antagonist와는 서로 상이하다는 것, 즉 Ca^{2+} channel의 internal binding site에 kanamycin이 Ca^{2+} 이온과 경쟁적으로 결합해서 Ca^{2+} 전류를 억제하는 것은 아님을 시사한다. 그러나 외부 Ca^{2+} 농도 증가시 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 감소효과가 억제되는 현상은 Ca^{2+} 과 kanamycin이 같은 binding site에 서로 경쟁적으로 결합하여 kanamycin의 효과가 나타나는 경우에도 관찰할 수 있으나, 외부 Ca^{2+} 농도 증가시 kanamycin에 의해 차단되지않은 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 전류의 크기가 상대적으로 증가하여 kanamycin에 의한 Ca^{2+} 전류 억제 효과가 상쇄되어 나타날 가능성도 있으므로 이는 차후의 연구에서 규명하고자 한다¹⁴⁾.

한편 여러 종류의 Ca^{2+} 길항제들의 Ca^{2+} 전류 억제 효과가 심근 세포막전압의 크기에 따라 변화하는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 kanamycin에 의한 Ca^{2+} current 감소 효과 역시 막전압 의존적으로 변화하는지, 즉 기존의 잘 알려진 organic Ca^{2+} antagonists(verapamil)의 경우와 동일하게 막전압의 탈분극 정도에 비례하여 그 효과가 증가하는지, 혹은 Cd^{2+} 이나 nifedine의 경우와 같이 막전압에 무관하게 그의 효과를 나타내는지를 알아보려고 하였다. 관류액에 verapamil을 첨가한 경우 자극 중단후 첫 저분극 자극시 나타나는 Ca^{2+} current의 크기는 대조군과 거의 유사하였으나 자극을 반복함에 따라 급격하게 Ca^{2+} current의 크기가 억제되는 전형적인 "use dependency" 양상을 볼 수 있었으나(Fig. 7-B, E) 관류액에 Cd^{2+} 을 첨가한 경우에는 자극 중단후 첫 저분극 자극시 이미 Ca^{2+} 전류의 크기가 현저히 감소되어 있었으며, 계속되는 반복 자극시에도 전류의 크기가 거의 변화하지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 반면에 관류액에 kanamycin을 첨가한 경우에는 자극 중단 후의 첫 탈분극 자극시 나타나는 Ca^{2+} current의 크기가 대조군에 비해 비교적 감소되어 있었으며, 이후의 반복 자극에 의해서 Ca^{2+} current의 크기가 서서히 감소하는 양상을 관찰할 수 있었으나 그 정도는 미약하였다(Fig.

6-A, D). 이같은 실험 결과 역시 kanamycin의 Ca^{2+} 전류 억제 효과가 기존의 알려진 verapamil과 같은 organic Ca^{2+} antagonist나 혹은 Cd^{2+} 과 같은 inorganic Ca^{2+} antagonist와는 서로 다름을 시사한다.

이상의 실험 결과로 보아 kanamycin과 같은 aminoglycoside 계통의 항생제는 Ca^{2+} 길항제적 효과를 갖고 있으나, 기존에 보고된 organic Ca^{2+} antagonist나 inorganic Ca^{2+} antagonist과는 다른 기전으로, 즉 세포막의 유동성에 영향을 끼쳐서 Ca^{2+} 전류를 억제할 가능성이 있으나¹⁾ 이에 대해선 차후의 연구에서 추구해야할 과제라고 생각된다. 또한 이들 aminoglycoside 계통의 항생제가 Ca^{2+} channel의 gating property나 kinetic 등에 미치는 효과 역시 single channel patch clamp 등의 방법을 이용하여 차후의 연구에서 추구하고자 한다.

요 약

임상에서 감염성 질환의 치료제로 사용되고 있는 aminoglycoside 계통의 항생제 중의 하나인 kanamycin은 신장 및 청각 계통에 대한 독성 이외에 순환 기계에도 장애를 초래함이 보고되었다. 즉 kanamycin의 투여 농도에 비례하여 심근의 수축력이 저하되며, 분리한 심근막에서의 Ca^{2+} 결합을 경쟁적으로 억제하며, 고농도 K^{+} -유발 활동전압의 크기 및 탈분극 속도를 저하시킨다는 보고 등은 kanamycin이 calcium 전류에 대해 길항제적 효과를 갖고 있음을 추측케 한다. 따라서 본실험에서는 단일 심근 세포를 이용한 막전압 고정법을 통해 kanamycin이 Ca^{2+} current에 미치는 영향을 직접 측정함으로써 kanamycin의 Ca^{2+} 길항제적 성상의 특징과 kanamycin에 의한 심근 수축력 저하의 기전을 규명해 보고자 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Kanamycin 투여량에 비례하여 Ca^{2+} current의 크기가 감소하였고, 이같은 감소 효과는 모든 막전압 값에서 관찰되었다.

2) 관류액의 Ca^{2+} 농도를 2mM에서 20mM로 증가시킨 경우 kanamycin에 의한 Ca^{2+} current 감소 정도는 아주 미약하였으며, 이같은 현상은 관류액의 Ca^{2+} 을 20mM Sr^{2+} 으로 대체한 경우에도 동일하게 관찰되었다. 반면에 inorganic Ca^{2+} antagonist인 Cd^{2+} 은 관류액의 charge carrier로 20mM Sr^{2+} 을 사용한

경우, charge carrier로 20mM Ca^{2+} 을 사용한 경우에 비해 Ca^{2+} channel을 통한 전류의 크기를 현저히 감소시켜 주었다.

3) 반복되는 탈분극 자극시 kanamycin에 의한 Ca^{2+} current의 감소 정도(use dependency)는 verapamil (organic Ca^{2+} antagonist)의 경우와 같이 특징적이지 못하였다.

4) Neomycin 역시 kanamycin과 유사하게 Ca^{2+} current를 감소시켜주었다.

이상의 실험 결과로 보아 kanamycin과 같은 aminoglycoside 계통의 항생제는 기존에 보고된 Ca^{2+} 길항제들과는 다른 기전으로 Ca^{2+} 전류를 억제함을 알 수 있었다.

References

- 1) 이승일 · 강두희 : Kanamycin 및 Kanendomyacin이 인공 stearic acid 단분자막에 미치는 영향. 대한생리학회지 9 : 93-97, 1975
- 2) 이영호 · 안덕선 · 서창국 · 강두희 : Kanamycin 이 심근의 slow inward Ca^{2+} current에 의한 수축력에 미치는 영향. 연세의대 논문집 17 : 493-503, 1985
- 3) Bean BP : Nitrendipine block of cardiac calcium channels : high affinity binding to the inactivated state. Proc Natl Acad Sci USA 81 : 6388-6392, 1984
- 4) Campbell DL, Giles WR, Hume JR, Noble D, Shibata EF : Reversal potential of the calcium current in bull-frog atrial myocytes. J Physiol 403 : 287-315, 1988
- 5) Campbell DL, Giles WR : Calcium Current. In Calcium and the Heart. p27-83 New York, Raven Press, 1990
- 6) Cohen LS, Wechsler AS, Mitchell JH, Glick G : Depression of cardiac function by streptomycin and other antimicrobial agents. Am J Cardiol 26 : 505-511, 1970
- 7) Gibbons WR : Cellular control of cardiac contraction. In Heart and Cardiovascular System. p447-478, New York, Raven Press, 1986
- 8) Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth J : Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflu Arch 391 : 85-100, 1981
- 9) Hess P, Lansman JB, Tsien RW : Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations : voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. J Gen Physiol 88 : 293-319, 1986
- 10) Isenberg G and Klockner U : Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. Pflugers Arch 395 : 30-41, 1982
- 11) Kass RS, Sanguinetti MC, Krafte DS : Inactivation and modulation of cardiac Ca channels. In Cardiac Muscle : The Regulation of Excitation and Contraction. p29-53, Orlando, Academic Press. Inc, 1986
- 12) Lansman JB, Hess P, and Tsien RW : Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. J Gen Physiol 88 : 321-347, 1986
- 13) Lee JW, Kang BS, Kang DH : Kanamycin as a Ca^{2+} -antagonist. Yonsei Med J 17 : 101-108, 1976
- 14) Lee KS and Tsien RW : Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. Nature 297 : 498-501, 1982
- 15) Lee KS and Tsien RW : Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D 600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. Nature 302 : 790-794, 1983
- 16) Lee KS and Tsien RW : High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig. J Physiol 354 : 253-272, 1984
- 17) Matsuda H, Noma A : Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea pig. J Physiol 357 : 553-573, 1984
- 18) New W, Trautwein W : The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. Pflu Arch 334 : 24-38, 1972
- 19) Noble D : The initiation of heart beat. 2nd ed. p53-63, Oxford, Clarendon Press, 1979
- 20) Parsons RD, Obaod AL and Salberg BM : Aminoglycoside antibiotics block voltage-dependent calcium channels in intact vertebrate nerve terminals. J Gen Physiol 99 : 505-530, 1992
- 21) Reuter H : Properties of two inward membrane current in the heart. Ann Rev Physiol 41 : 413-424, 1979
- 22) Reuter H : Calcium channel modulation by neurotransmitter, enzymes, and drugs. Nature 301 : 569-574, 1983
- 23) Reuter H : Ion channel in cardiac cell membranes. Ann Rev Physiol 46 : 473-484, 1984
- 24) Sande MA, Mandell GL : Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 7th ed. p1150-1169, New york, Macmillan Publishing Co, 1985

- 25) Sanguinetti MC and Kass RS : *Voltage dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. Cir Res 55 : 336-348, 1984*
- 26) Tsien RW : *Calcium channels in excitable cell membranes. Ann Rev Physiol. 45 : 341-358, 1983*