

## 단일심근세포의 활동전압 및 막전류에 대한 Na-Ca 교환기전의 영향

한양대학교 의과대학 내과학교실  
김정현 · 임헌길 · 이방현 · 이정균

서울대학교 의과대학 생리학교실  
엄        용        의

= Abstract =

### Effects of Na-Ca Exchange Mechanism on the Action Potential and Membrane Currents in the Single Cells of the Guinea-Pig and the Rabbit Heart

Jeong Hyun Kim, M.D., Heon Kil Lim, M.D.  
Bang Hun Lee, M.D., Chung Kyun Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Hanyang University Medical College*

Yung E Earm, M.D.

*Department of Physiology, Seoul National University Medical College*

In single atrial and ventricular cells isolated from the guinea-pig and the rabbit heart, action potentials and membrane currents were recorded by using the whole cell voltage clamp technique. In rabbit atrial cells the repolarization showed two distinctive phases, referred as the early and late phases(early and late plateau phase), but in guinea-pig atrial cells there was a maintained plateau and less distinctive two phases of repolarization. Increasing intracellular sodium or reducing external sodium by replacement with lithium suppressed the late phase of the action potential in rabbit atrial cells and shortened the plateau of action potential in rabbit ventricle and guinea-pig atrial cells. Reducing external sodium decreased Ca-current and late inward current in voltage clamp.

Ouabain in the concentration of  $10^{-5}$ M shortened the duration of action potential and shifted the holding current level to outward direction, decreased Ca-current and moved late inward current to outward direction. Ryanodine  $10^{-6}$ M which is known to be an inhibitor of Ca-release in the intracellular store, suppressed the late phase of action potential in rabbit atrial cells and shortened the plateau of action potential in rabbit ventricular cells. Ryanodine also decreased Ca-current and shifted late inward current to outward direction.

It is concluded that an inward current activated by intracellular calcium contributes to the late

phase of the action potential in rabbit atrial cells and to the late plateau in rabbit ventricular cells and in guinea-pig atrial cells. It may be carried by the Na-Ca exchange process and/or by calcium-activated non-specific channels but preferably Na-Ca exchange mechanism.

KEY WORD : Cardiac myocytes · Na-Ca exchange · Sodium reduction · Ouabain · Ryanodine · Ca-currents.

## 서 론

심근세포의 활동전압중 plateau기의 유지에  $\text{Ca}^{2+}$ 이 중요한 역할을 담당한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>1)</sup>. 그러나  $\text{Ca}^{2+}$  전류( $I_{\text{Ca}}$ ) 이외에 다른 종류의 이온전류 또한 plateau 유지에 관여함이 알려져 왔다<sup>2)</sup>. 특히 단일 심근세포에서 기록되는 Ca-전류<sup>3)</sup>를 보면 매우 빠른 시간내에 활성화 되고 수 ms내에 최고치에 도달함이 알려져 오직 plateau의 초기에만 관여할 가능성이 높다. 또한 활동전압 기간은 K-전류에 의하여 크게 달라짐이 알려져 일과성외형전류(transient outward current,  $I_{\text{to}}$  혹은  $I_{\text{a}}$ )<sup>4)</sup>, background inward rectifier ( $I_{\text{k}}$  inward rectifier)<sup>5)</sup> 그리고 느리게 활성화되는 K-전류(delayed rectifier,  $I_{\text{k}}$ )<sup>6)</sup> 등이 흥미의 대상이 되어왔다. 특히 쥐심장의 심실근세포에서 Ca-전류에 의한 활동전압 plateau 유지는 극히 초기에 국한되고 plateau의 후기 부분은 좀더 낮은 막전압 범위에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 과 관련있는 내향전류에 의하여 일어날 것이라는 실험결과<sup>7)</sup>들이 많이 제시되었다. 그리고 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도에 따라서 활성화되는 내향 전류로서는 Na-Ca 교환기전<sup>8)</sup>일 가능성과 비 선택적인 양이온 통로(non-selective cation channel)<sup>9)</sup>일 가능성이 고려되고 있다.

심근에서 Na-Ca 교환기전이 존재함은 guinea-pig 심방근에서 처음으로 증명되었다<sup>10)</sup>. 그들은  $^{45}\text{Ca}$ 의 유출(efflux)이 세포밖  $\text{Na}^+$ 에 의하여 결정됨을 발견하였고 계속하여 Ca의 유입(influx)이 세포내  $\text{Na}^+$ 에 의하여 일어남을 보고하여<sup>11)</sup> Na-Ca 교환기전이 양방향으로 일어날 수 있음을 증명하였다. 비슷한 Na-Ca 교환기전이 역시 다른 조직, 예를 들어 가제 신경섬유<sup>12)</sup>, 오징어 거대 축삭돌기<sup>13)</sup>에서 발견되었고 그후에 여러가지 조직에서 보고된 바 있다<sup>14)</sup>.

Na-Ca 교환기전의 에너지 공급원으로서 Blaustein & Hodgkin<sup>15)</sup>은 CN으로 처리한 축삭돌기에서 세포막을 경계로 해서 존재하는  $\text{Na}^+$ 과  $\text{Ca}^{2+}$ 의 전기화학적 경사(electrochemical potential gradient)임을 증명하였고 동시에  $\text{Na}^+$ 와  $\text{Ca}^{2+}$ 의 교환비율이 3:1 혹은 4:1임을 시사하여 Na-Ca 교환기전이 전기발생적임을 암시하였다. 그후 많은 연구자들이 방사선 동위원소를 이용하여 축삭돌기<sup>16)</sup>, 심근세포막 vesicle<sup>17)</sup> 그리고 정상 심근조직<sup>18)</sup>등에서 Na-Ca 교환기전의 특성을 연구하여 교환비율이 3:1이고 전기 발생적임을 확인하였다. 그러나 Na-Ca 교환기전에 의하여 발생하는 전류를 기록하기 위한 노력은 대단히 많았으나 다른 막전류와 구분하기가 어려웠기 때문에 성공하지 못하였다<sup>19)</sup>. 그러나 최근에 발달된 단일세포의 막전압 고정법과 patch 전극내 관류법<sup>20)</sup>을 이용하여 Na-Ca 교환 전류를 기록하는데 성공하였고<sup>8)</sup> 이 Na-Ca 교환전류는 활동전압 발생에 관여할 가능성이 많아졌고 특히 plateau 후반부에 관여할 것이라는 실험결과 및 model<sup>21)</sup>이 제시되어 많은 관심을 끌고 있다.

이에 본 연구에서는 guinea-pig 심방근, 토끼 심방근 및 심실근에서 활동전압 및 막전류를 기록하고 plateau 후반부에 관여하리라 생각되는 내향전류를 Na-Ca 교환기전이라는 가정하에 Na-Ca 교환 기전에 영향을 주는 자극 효과, 세포내  $\text{Na}^+$  농도변화, 세포밖  $\text{Na}^+$  농도감소, Na-펌프 억제제인 ouabain 투여, 세포내 저장고로부터의 Ca-유리를 억제하는 것으로 알려진 ryanodine<sup>22)</sup>을 투여하여 그 효과를 분석하고자 하였다.

본 실험의 목적은 단일심근세포에서 활동전압이 plateau 후반부를 이루는 세포막기전의 Na-Ca 교환기전임을 증명하는데 있다. 이 가정을 증명하기 위하여 먼저 활동전압을 기록하고 Na-Ca 교환기전에

영향을 주는 인자들(세포내  $\text{Na}^+$  농도, 세포밖  $\text{Na}^+$  농도,  $\text{Na}^+$  펌프 활동억제,  $\text{Ca}^{2+}$ -유리억제등의 효과를 관찰한다. 활동전압 plateau 후반부에 변화가 나타나면 다시 막전압 고정법으로 막전류( $\text{Ca}^{2+}$ -전류 및 기타전류)를 기록하여  $\text{Ca}^{2+}$ -전류나  $\text{K}^+$ -전류에 의한 변화가 아니고,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  교환전류에 의한 내향전류임을 분명히 하여  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  교환기전이 plateau 유지에 중요하고 결국 수축성 조절에 중요한 역할을 하고 있음을 밝히고저 한다.

## 재료 및 방법

500g내외의 guinea-pig, 1kg내외의 토끼를 사용하여 실험하였다. 단일 심근세포의 분리는 guinea-pig의 경우는 pentobarbital sodium(60mg/kg)과 heparin(2000IU/kg)을 복강내로 주사하여 마취한 다음 경동맥을 잘라 실험시키고 가슴을 열어 심장을 적출하였다. 토끼의 경우는 pentobarbital sodium(30mg/kg)과 heparin(2000IU/kg)을 귀정맥(ear vein)을 통하여 정맥주사하여 마취하였으며 마취가지로 경동맥을 잘라 실험시키고 심장을 적출하였다. 적출한 심장은 100%  $\text{O}_2$ 로 포화된 30°C 내외의 정상 Tyrode 용액속에 옮기고 대동맥에 cannula를 삽입하여 관상동맥을 통하여 정상 Tyrode 용액으로 약 80cmH<sub>2</sub>O의 압력으로 Langendorff 관류를 하였다.

그런후에  $\text{Ca}^{2+}$  없는 Tyrode 용액으로 다시 수분간 관류시키고 심장박동이 멈추고 난뒤 0.04% Collagenase(Sigma, type I)가 포함된  $\text{Ca}^{2+}$  없는 Tyrode 용액으로 약 20~30분 관류시켰다. Collagenase 소화후에 높은  $\text{K}^+$ 과 낮은  $\text{Cl}^-$ 과 포함된 저장용액으로 관류하여 Collagenase를 씻어내고 세포의 생존율을 높이하고자 하였다. 소화된 심장을 심방과 분리하여 각각 저장용액속에서 forceps을 사용해 계속 흔들여 주어 떨어져 나온 세포현탁액을 4°C 에 저장 보관하였다. 보관된 혈액액 일부를 실험용기에 옮겨 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus LMT-2) 시야에서 실험하였고 용액은 정수압을 이용하여 계속 관류시켰으며(2ml/min) 용액온도는 35°C 로 유지하였다.

### 1) Patch Clamp방법

단일 심근 세포에서 patch clamp 증폭기를 이용하여 whole cell clamp방법(Hamill et al, 1981)을 사용하였다. 활동전압은 전류고정방식(current clamp mode)으로 기록하였고 막전류는 전압고정방식(voltage clamp mode)으로 기록하였다. patch 전극은 borosilicate 유리관(내경 1.0mm)을 두단계로 뽑아 전극저항이 2-4M $\Omega$ 되는 것을 사용하였다. 대개 심근세포에서는 저항이 낮은것을 사용하였고 심장근 세포의 경우에는 저항이 높은 것을 사용하였다.

전극내 용액은 활동전압 및 일부심방근에서의 막전류기록시에는  $\text{K}^+$ 이 주성분인 용액을 사용하였고 막전압 고정실험에서는 주로  $\text{Cs}^+$ 이 주성분인 용액을 사용하여  $\text{K}^+$ -전류의 관여를 억제하고자 하였다. Gigaseal의 성공은 1mV의 pulse를 100ms에 1번씩 반복하여 주어 나타나는 전류의 크기가 무시할 정도로 작아지는 때를 기준으로 하였는데 이때 -20cmH<sub>2</sub>O가량의 음압을 가하여 gigaseal이 완전히 이루어진 것을 확인한 다음 -50cmH<sub>2</sub>O정도의 음압을 가하여 전극내의 세포막을 파열시켰다. 이때 세포막의 파열이 불충분하게 되었을 경우에는 약간 더 강한 음압을 주었고 일단 파열후에는 -30cmH<sub>2</sub>O의 음압을 가하여 세포막이 resealing되는 것을 방지하였다.

### 2) 전극내 투석법

patch 전극끝으로 부터 0.3mm 이내에까지 polyethylene관을 아주 가늘게 뽑아 삽입하여 새로운 용액으로 바꿀 수 있게 하는 세포내 투석법(intracellular dialysis, Soejima & Noma 1984 ; Earm & Irisawa 1986)을 사용하여 전극내 용액을 바꿔주었고 결국 세포내 용액성분의 변화를 일으켰다. 세포내 용액이 전극과 평형이 되는 시간은 세포의 크기, 전극끝의 직경에 따라서 차이를 보일 가능성이 있었기 때문에 충분한 시간(10분 혹은 그이상)을 기다린 다음 실험하였다.

### 3) 실험용액

정상 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 140mM, KCl 5.4

mM, CaCl 1.8mM, MgCl 1.0mM, HEPES 5mM, glucose 5.5mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4mM이고 pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추었다. Ca 없는 Tyrode 용액은 단순히 Ca만을 넣지 않고 만들었다. 저장용액 glutamic acid 70mM, KCl 25mM, taurine 10mM, oxalic acid 10mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM, HEPES 10mM, glucose 11mM, EGTA 0.5mM의 조성으로 만들었고 pH는 KOH로 적정 7.4로 맞추었다. 전극내를 채우는 용액은 활동전압 및 일부막전압 고정실험에서는 K-aspartate 110mM, Mg-ATP 5mM, creatine phosphate 5mM, HEPES 5mM, MgCl 1mM, KCl 20mM이 포함된 용액(pH 7.4)을 사용하였고 막전압 고정실험에서는 K-aspartate 대신 Cs-aspartate 그리고 KCl 대신 TEA-Cl 혹은 Cs-Cl로 대체하고 pH는 CsOH로 적정하여 7.4로 만들어 사용하였다. 그리고  $\text{Na}^+$  감소실험에서는  $\text{Na}^+$ 대신 동량의  $\text{Li}^+$ 으로 대체하여 실험하였다.

#### 4) 사용기기 및 분석

patch clamp 증폭기(List EPC-7)를 사용하여 막전류 혹은 활동전압을 증폭하였고 증폭된 실험 결과는 digital oscilloscope(Hitachi, 6041)로 관찰하면서 PCM data recorder(SONY 501 ES 및 VCR)에 저장하였다. 전압 pulse는 자극기(Nihon Kodan SEN

7103)를 사용하여 가하였고 실험결과는 기록기(Harvard Oscillograph)와 XY recorder(Graphtec WX 2400)로 뽑아 재생분석하였다. 모든 실험결과는 동일한 경향의 성적이 3~5회 반복되는 경우에만 유의한 것으로 판단하였고 실험조건에 의한 반응의 변화는 동일 세포에서 이루어진 것 끼리만 비교하였다.

### 성 적

본실험에서는 guinea-pig 심방근세포, 토끼 심방근세포를 사용하였는데 드물게는 심실근도 사용하였다. 동물의 종류나 심장의 부위에 따라서 활동전압의 모양이 각각 다르기 때문에 Na-Ca 교환기전이 얼마나, 어떻게 공헌하는지는 차이가 많았다. 먼저 오래 안정한 다음 0.5Hz로 자극을 시작할때 맨처음 나타나는 활동전압과 그다음에 계속되는 활동전압에 상당한 차이가 있다.

그림 1은 guinea-pig 심근에서 제1자극과 제2자극에 의한 활동전압을 중첩하여 그려본 것으로 재분극의 후반부가 첫번째 자극에 의하여 발생한 활동전압에서 더욱 길게 나타났다. 이는 빈도수에 따라 활동전압을 일으키는 이온전류에 차이가 있음을 뜻한다. 0.5Hz의 자극 빈도에서 두번째 자극부터 어떤

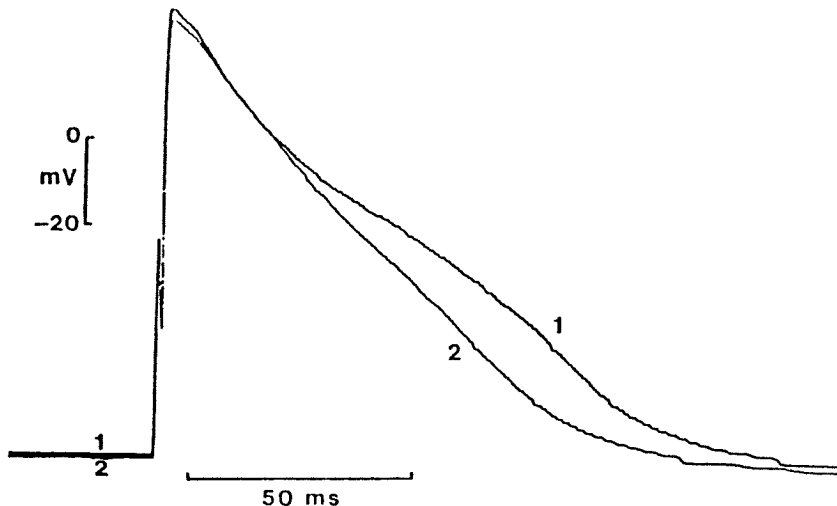


Fig. 1. Superimposed records of action potentials from guinea-pig atrial cells by first and second stimulation. (1) indicates a first action potential and (2) indicates a second action potential after long rest ( $10'$ ). The first action potential shows slow repolarization than the second action potential.

이온전류의 활성정도가 첫번째와는 다른것을 시사한 것으로 Na-Ca 교환기전의 공헌가능성을 생각할 수 있겠다. Na-Ca 교환기전이 관여하는지 여부를 좀 더 직접 알아보기 위해서는 Na의 세포내의 농도경사를 바꿔준 다음 그 변화를 보면 Na-Ca 교환기전 가능성을 짐작할 수 있을 것으로 생각되어 먼저 세포내 Na 농도를 변화시켜 보았다.

그림 2는 토끼 심실근세포에서 세포내 Na 농도를 0, 10, 20mM로 바꿔주었을때 나타나는 활동전압을 중첩시켜 그린 것이다. 세포내 Na농도를 증가시키에 따라 안정막전압은 과분극되고 ( $-72\text{mV}$ 에서  $-75\text{mV}$ 로) 활동전압의 지나치기 전압크기가 감소하였으며, 기간은 250ms로 부터 10mM  $\text{Na}^+$  때는 200ms, 20mM 때는 170ms로 감소하였다. 이와같은 활동전압의 변화는 Na-Ca 교환기전의 관여인것으로 생각할수는 있으나 세포내 Na 농도증가에 의한  $\text{Na}^+$  펌프의 활성화에 의한 변화와 중복되어 나타나기 때문에 과연 어느정도가 Na-Ca 교환기전에 의한 것 인지는 알 수가 없었다. 이와 같은 난점을 극복하기 위하여 다음에는 세포밖 Na 농도를 변화시켰다.

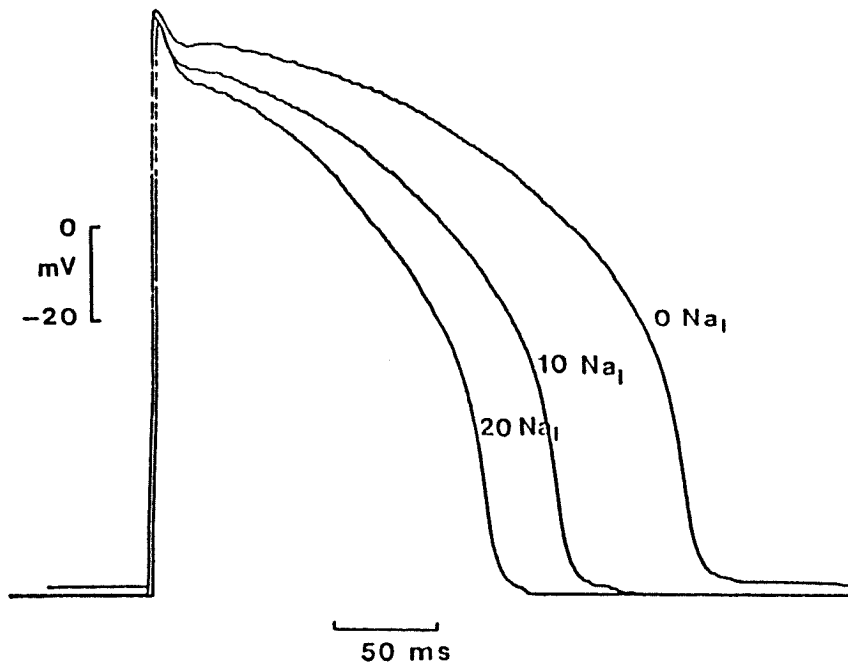


Fig. 2. Superimposed records of action potentials from rabbit ventricular cells in 0, 10 and 20mM  $\text{Na}^+$  of the pipette. Increasing  $\text{Na}^+$  concentration of the pipette shortened the plateau and the duration of action potential in concentration-dependent manner.

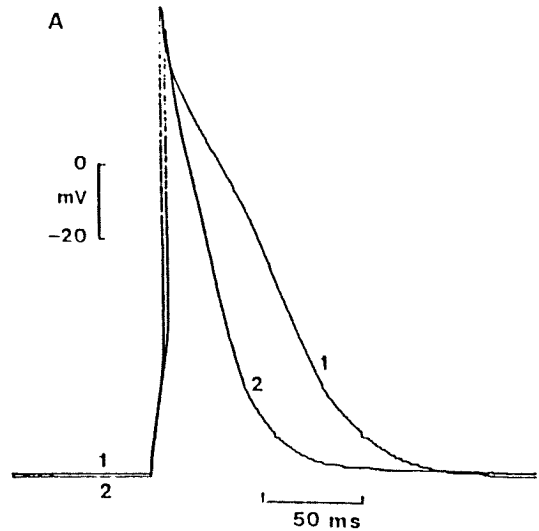


Fig. 3-A. Effect of 30% Na on the action potential (A), membrane currents (B) and IV relationship (C) in guineapig atrial cells. (A) : 30% Na (2) reduced the duration of action potential (1 : normal).

그림 3-A는 guinea-pig 심방근세포에서 100% Na일 경우와 30% Na(70%는 Li로 대체)에서 기록되는 활동전압을 같이 그린 것이다. 정상대조시 안정막 전압은  $-80\text{mV}$ , 활동전압 기간은  $100\text{ms}$ 였으나 30% Na로 바꿔주었을 때는 안정막전압은  $-81\text{mV}$ 로 약간 과분극되었고 기간은  $60\text{ms}$ 로 현저히 단축되었다. 이와같은 활동전압의 변화가 세포막을 통한 이온전류에 어떤 변화가 왔기 때문인지 알기 위하여 막전압 고정실험을 하였다.

그림 3-B에 보이듯이 유지전압(holding potential,

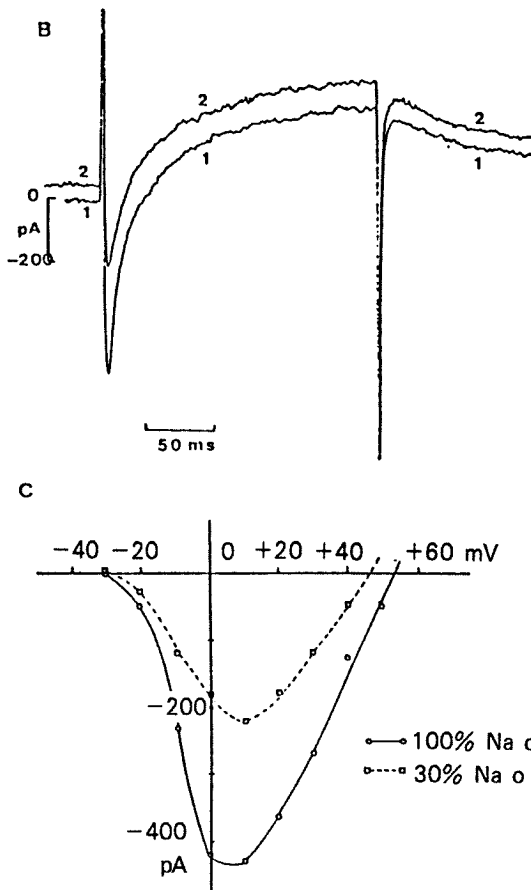


Fig. 3-B.C. Sodium reduction (2) decreased Ca-current, shifted the holding current level to outward direction and decreased the late inward current (1 : normal).

(C) : IV relation of Ca-Current in normal (0-0) and in 30% Na (□...□). (voltage pulse in B : 0 mV from HP  $40\text{mV}$ ).

HP)은  $-40\text{mV}$ 로 유지하다가  $0\text{mV}$ 의 막전압 pulse를  $200\text{ms}$ 동안 주었을 때 활성화되는 막전류를 나타내었다. 정상대조시 (1)에 비하여 30% Na (2)의 경우에는 유지전류가 외향으로 이동하였고 초기 내향전류로서 나타나는 Ca-전류는 감소하였고 계속하여 외향전류가 더 크게 활성화 되었다. 유지전류의 이동크기보다  $200\text{ms}$  동안에 활성화되는 외향전류 크기는 더욱 큰점으로 보아 그 차이점이 Na-Ca 교환기전에 의한 전류성분일 것으로 생각된다. 그러나 활동전압기간의 단축은 Ca-전류감소와 외향전류의 증가모두 가능한 기전이기 때문에 기간단축 현상 모두가 Na-Ca 교환기전이라고 볼수는 없을 것 같다.

그림 3-C에 Ca-전류의 전류-전압관계(current-voltage relationship, IV relationship)를  $-40\text{mV}$ 로부터  $+60\text{mV}$ 사이의 범위에서 그려보았는데 30% Na에 의하여 약 50% 가량 Ca-전류가 감소하였음을 잘 나타내주고 있다. 동일한 과정의 실험을 토끼 심방근에서 다시 반복하여 보았다.

그림 4-A에 보인것 처럼 정상대조 활동전압은 매우 특징적인 모습을 보인다. 이 경우는 아주 느린 자극  $0.1\text{Hz}$ 이하의 자극빈도에서 기록된 것으로 활동전압의 지나치기 전압직후 빠른 재분극 과정후에 다시 저분극 되었다가 느리게 재분극되는 모습을 보인다.

이때 다시 저분극되는 막전압 범위는  $-30\sim-40\text{mV}$  근처 혹은 그이하의 전압으로서 Na-전류나 Ca-전류가 활성화 된 것이라고 보기는 어렵겠다. 그림에서 (2)로 표시된 것은 30% Na에 의하여 나타난 활동전압이다. 특징적으로 활동전압 후반에 나타나는 느린저분극 과정이 현저하게 줄어들고 느린 저분극 부분도 매우 완만해진것을 알 수 있다. 이때의 막전압이나 시간경과로 보아 Ca-전류나 Na-전류와 관련짓기는 어렵고 Na-Ca 교환기전에 의한 현상일 것이라고 생각된다.

그림 4-B는 4-A에서와 동일한 조건에서 막전압 고정실험을 하여 기록된 막전류를 중첩하여 그린 것이다. 유지전압  $-40\text{mV}$ 로부터  $-10\text{mV}$  및  $+10\text{mV}$  두가지 저분극 pulse에 의하여 활성화된 전류로서 대조시(1)에 비하여 30% Na(2)때 현저한 외향전류의 증가(혹은 내향전류의 감소)를 볼 수 있다. 이와같은 외향전류의 증가는 활동전압의 후기 plateau 부분을 감소시키는 효과를 나타낼 것으로 생

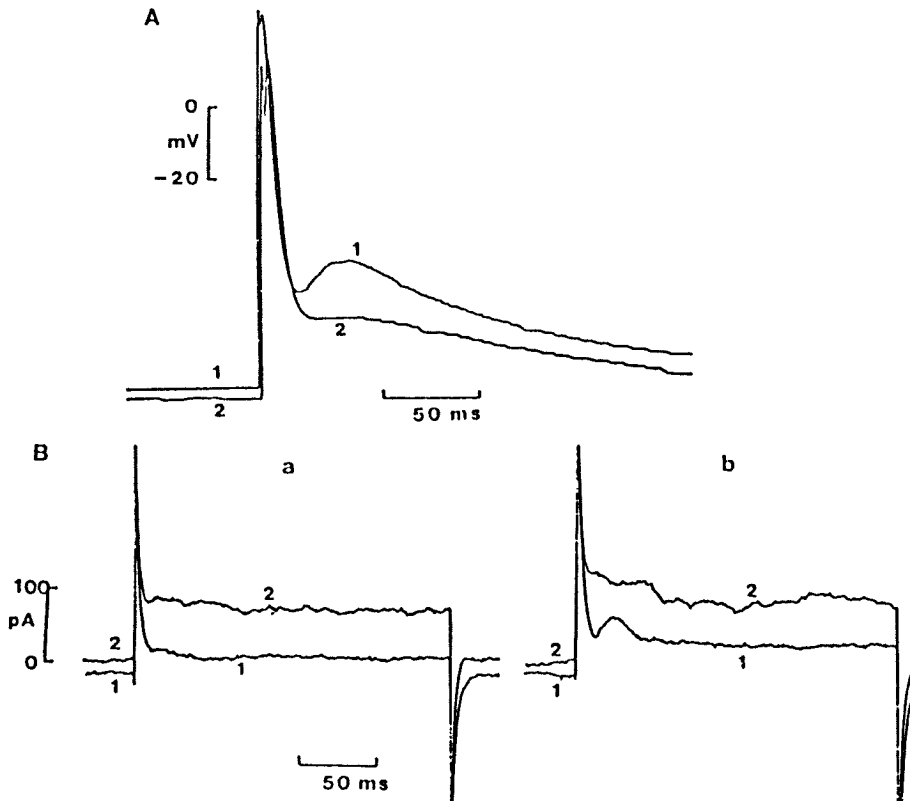


Fig. 4. Effect of sodium reduction on the action potential and membrane currents in rabbit atrial cells. (A) : Effect of 30% Na (2) on the action potential. Normal action potential (1) shows late phase of repolarization (late phase of plateau) but 30% Na suppressed the late phase. (B) : Membrane currents superimposed in normal (1) and 30% Na (2) when the membrane potential was held at -40 mV and depolarizing voltage clamp pulses of -10 mV (a) and +10 mV were applied.

각된다. 그러나 이 경우는 세포내용에  $K^+$ 이 주성분을 이루고 있었기 때문에 K-전류의 관여기능성을 배제할수는 없었다. 이러한 점을 해결하기 위하여 세포내용액을 K-전류를 억제할 수 있는 Cs이 주성분인 용액으로 하여 막전압 고정실험을 하고 30% Na의 효과를 관찰하였다.

그림 5-A에 유지전압 -40mV로부터 10mV 간격으로 +40mV까지 200ms 동안 저분극 pulse를 가하였을 때 활성화되는 전류를 중첩하여 나타내었다. 그림 a는 정상대조시의 막전류이고 그림 b는 30% Na때 막전류로서 전체적으로 Ca전류감소가 뚜렷하였다.

그림 5-B는 -10mV(a), +10mV(b) 및 +40mV(c)에서 대조시 (1) 및 30% Na(2)때 활성화되는 전류를

같이 나타낸 것이다. 30% Na때는 Ca-전류의 감소가 현저하고, 유지전류는 외향방향으로 이동되었으며, Ca-전류가 비활성화 된 다음에 나타나는 느린 내향전류 성분도 같이 감소한 것을 알 수 있다. 이와같은 내향전류의 감소는 세포외액의 Na 농도감소 때문에 세포내외의 Na-경사가 줄어들어 그 결과 Na-Ca 교환기전(전류)에 의한 내향전류 성분이 감소된 것으로 해석할 수 있겠다. 다음은  $10^{-5}M$ 의 ouabain을 투여하여 Na-펌프를 억제하고 그 결과 세포내 Na 농도를 증가시켜 보았다.

그림 6-A는 guinea-pig 심방근세포에서 기록된 활동전압을 대조시 (1) 및  $10^{-5}M$  ouabain 처치시 (2)에 각각 중첩시켜 본 것이다.

Ouabain에 의하여 막전압은 -62mV로 부터 -60

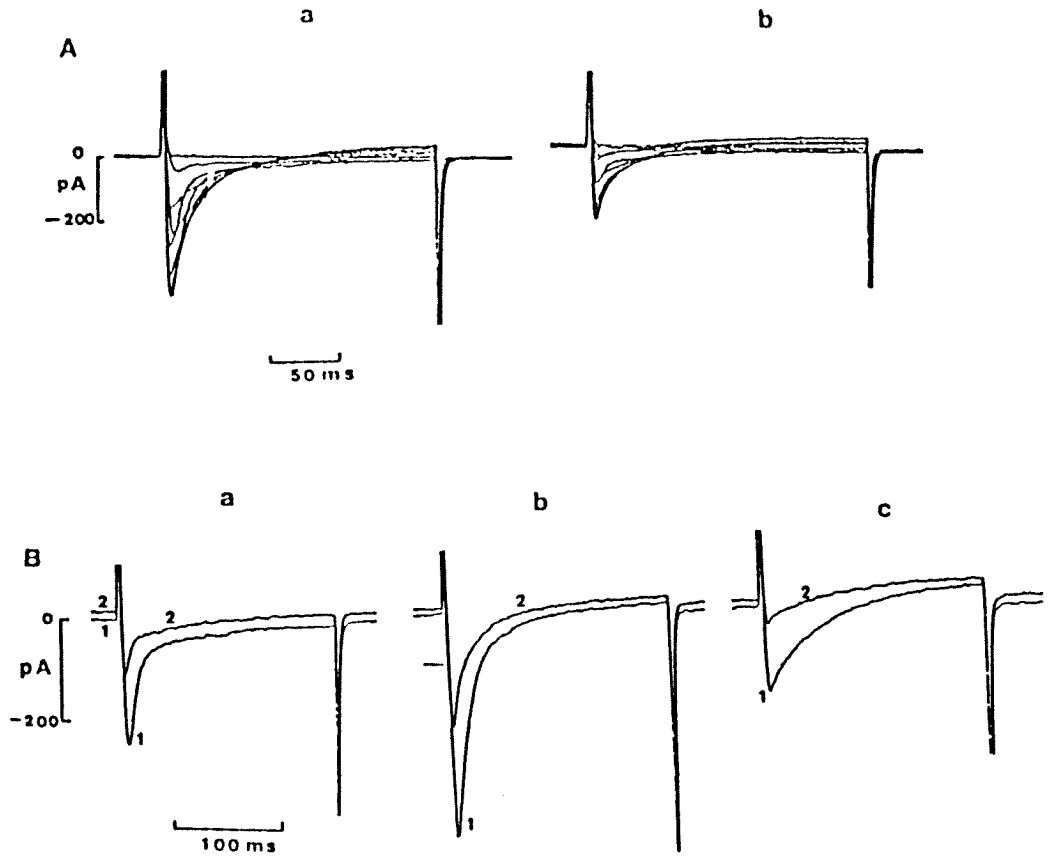


Fig. 5. Membrane currents activated by depolarizing voltage clamp pulses in Cs-loaded rabbit atrial cells. (A) : Membrane currents in normal (a) and 30% Na(b) when the initial solution of the pipette was replaced by Cs<sup>+</sup> instead of K<sup>+</sup> (B) : Superimposed membrane current in normal (1) and 30% Na (2) at -10 mV (a), +10mV (b) and +40 mV(c) respectively.

mV로 저분극되었고 활동전압의 크기가 감소하였고 특히 활동전압의 기간이 85ms로 부터 45ms로 현저히 줄어들었다.

동일한 상태에서 막전압 고정실험을 하여 막전류를 기록한 것이 그림 6-B이다. 이때는 유지전압 -40 mV로부터 200ms 동안 0mV의 저분극 pulse를 주었을 때 나타나는 전류를 대조시(1)와  $10^{-5}$ M ouabain (2) 처리시 중첩시켜 나타내었다. ouabain은 유지전류를 외향방향으로 이동시켰으며 Ca-전류가 감소하였고 느린 내향전류 성분이 외향전류로 크게 변화하였다. 마찬가지로 실험조건을 토끼 심방근에서 시도하여 보았다.

그림 6-C는 유지전압 -35mV에서 +5mV(a) 및

+35mV에서 활성화되는 막전류를 그린 것이다. 정상대조시(a)에 비하여  $10^{-5}$ M ouabain 처리시(2)에는 Ca-전류가 약간 감소하였고 느린 전류성분이 외향방향으로 크게 증가하였다. 이러한 막전류의 변화는 활동전압의 plateau 감소에 모두 기여할 것으로 생각된다. 이번에는 세포내 소기관인 근장그물(sarcoplasmic reticulum)으로 부터 Ca<sup>2+</sup> 유리를 억제하는 물질인 ryanodine을 투여하여 Ca-농도 경사에 변화를 주어, 즉 세포내 Ca-농도가 낮아져서 Ca<sup>2+</sup> 이동이 세포내에서 세포외로 이동하는 원동력을 감소시킨 상태에서 활동전압 및 막전류의 변화를 관찰하였다.

그림 7-A는 토끼 심방근세포에서 정상대조시(1)



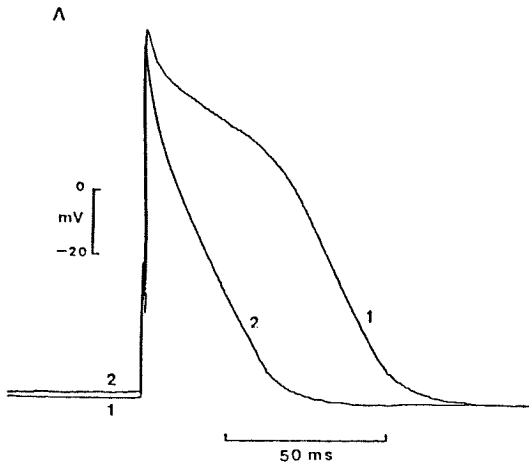


Fig. 6-A. Action potentials and membrane currents by ouabain  $10^{-5}M$  in guinea-pig and rabbit atrial cells.

(A) : Superimposed action potentials in normal(1) and ouabain-treated (2) condition. Ouabain reduced the duration and decreased the plateau of action potential in guinea-pig atrium.

및  $10^{-6}M$  ryanodine 투여시(2) 기록되는 활동전압을 중첩시킨 그림이다. 대조시에는 빠른 재분극이 일어나고 곧이어 느리게 다시 저분극 되었다가 느리게 재분극되는 활동전압의 후반부 plateau 부분이 뚜렷하다. 이런 상태에서  $10^{-6}M$  ryanodine은 후반부 plateau 부분을 현저히 감소시켜 빠른 재분극 시기가 지난다음 바로 느린 재분극 상태로 이행하는 활동전압이 나타났다. 즉 ryanodine에 의하여 후반부 plateau 성분이 대부분 소실되었는데 이는 ryanodine에 의하여 근장그물에서 Ca-유리가 억제되고 그 결과 Ca이 밖으로 나가려는 원동력이 크게 감소하므로 Na-Ca 교환기전의 내향전류 성분(Na는 세포밖에서 세포속으로 이동하고 동시에 Ca이 세포밖으로 이동하는 교환기전)이 크게 감소하여 발생된 것으로 생각된다. 이와 동일한 실험을 토끼 심실근에서도 시도하여 보았다.

그림 7-B에 보이는 것처럼 활동전압의 크기가 ryanodine에 의하여 감소하였고 특히 기간의 감소가 아주 현저하게 550ms로 부터 300ms로 줄어들었다. 심실근 활동전압의 모양은 plateau가 대단히 길어서 심방근에서와 같이 빠른 재분극, 느린 재분극 그리고

후반부 plateau 성분이 구분되지 않기 때문에 Na-Ca 교환기전의 감소에 의하여서만 이런 변화가 나타났는지 여부는 판단하기 어려웠다.

그림 7-C는 심방근에서 세포내 용액을 Cs으로 한 다음 막전압 고정실험을 한 결과이다.  $10^{-6}M$  ryanodine(2)는 대조시(1)에 비하여 유지전류를 내향방향으로 이동시켰고 유지전압  $-40mV$ 로 부터  $0mV$ 로 전분극 pulse를 주었을때 Ca-전류를 감소시켰으며 느린 내향전류성분을 외향방향으로 이동시켰다. 외향방향의 이동은 유지전류가 내향으로 변화한것을 고려하면 더욱 커짐을 알수 있었고 이는 ryanodine에 의하여 내향전류 성분이 감소하였음을 말하여 준다.

## 고 찰

본 실험에서 얻어진 주요결과를 요약하면 첫째 세포밖  $Na^+$  농도 감소는 guinea-pig 심방근세포, 토끼 심방근세포에서 모두 활동전압의 후반부 plateau 부분을 감소시켰다. 둘째는 ouabain 투여에 의하여서도 심방근 활동전압의 후반부 부분이 감소하였고, 셋째 ryanodine 또한 심방근 및 토끼 심실근의 후반부 plateau를 모두 감소시킨 점이다. 활동전압 후반부가 세포밖  $Na^+$  농도감소에 의하여 감소한 사실은 낮은  $Na^+$  용액에서는 Ca-전류의 크기도 감소한 결과 때문에 설명이 용이하지 않다. 낮은  $Na^+$  용액에서 Ca-전류가 감소한다는 사실은 다른 조직에서도 잘 알려져 있으며<sup>7)</sup> 활동전압 기간의 감소는 Ca-전류의 감소 때문에 일어날 수 있다.  $Na^+$  농도감소에 의한 Ca-전류의 감소는 세포내  $Ca^{2+}$  농도증가 때문에 Ca-전류의 비활성화가 촉진되어 나타날 수 있다<sup>23)</sup>. 그러나 활동전압의 후반부 부분과 막전류에서 Ca-전류의 비활성화 다음에 존재하는 느린 내향전류 성분은 Ca-전류라고 보기에는 활성화 및 비활성화 시간경과와 막전압 의존성의 특성이 다르다. 그러나 뒷부분 내향전류 성분이  $Na^+$ 에 의하여 일어난다면 세포밖  $Na^+$  농도감소는 바로 이 내향전류의 감소를 초래할 수 있을 것이다. 이러한 내향전류로서 가능한 기전은 다음 두가지를 생각할 수 있을 것이다.

1) Na-Ca 교환전류<sup>24)</sup>일 가능성 즉 세포밖  $Na^+$ 이 세포속으로 들어오고 대신 세포내  $Ca^{2+}$ 이 밖으로 이동되는 교환기전으로 3개의  $Na^+$ 와 1개의  $Ca^{2+}$ 이

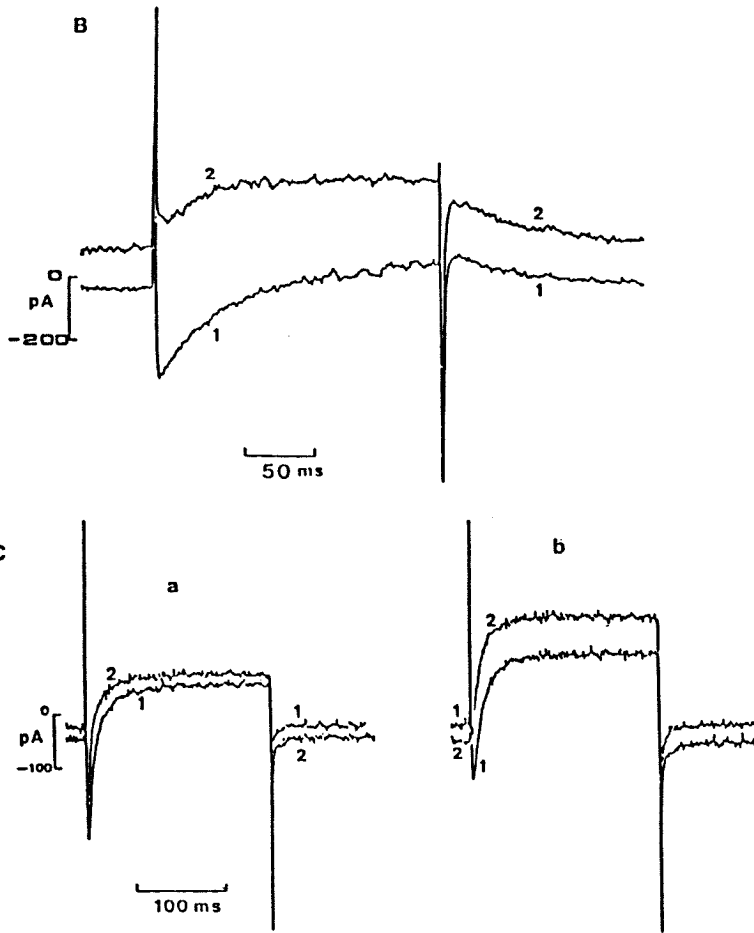


Fig. 6-B.C. Superimposed membrane currents in normal (1) and ouabain (2) at +40 mV. Ouabain shifted the holding current level to the outward direction and reduced Ca-current and the late inward current. (HP: -40 mV).

(C) : Superimposed membrane currents in normal (1) and ouabain (2) at +5mV(a) and +35 mV(b). Ouabain decreased Ca-current and the inward current.

교환되어 전기발생적(electrogenic) 기전일 가능성과

2) 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도증가에 의하여 활성화되는 비선택적 양이온 통로(non-selective cation channel)의 가능성을 생각할 수 있다.

본실험 결과에서 보면 Na-Ca 교환기전의 가능성이 더욱 크다. 왜냐하면 본실험에서  $\text{Na}^+$  대신  $\text{Li}^+$ 을 사용하였기 때문에 비선택적 양이온 통로일 가능성은 희박하다( $\text{Li}^+$ 도  $\text{Na}^+$ 과 거의 동일한 투과성을 보일 것으로 생각되기 때문에). 그러나 30% Na 사

용시 Ca-전류도 감소하였기 때문에 활동전압이나 막전류의 변화가 모두 Na-Ca 교환기전에 의한 것으로 보기는 어려울 것 같다. 그러나 토끼 심방근 세포의 경우 활동전압 후반부 plateau 부위는 막전압 범위나 시간경과로 보아 Ca-전류와 관련짓기는 어렵기 때문에 대부분 Na-Ca 교환기전에 의한 변화일 것으로 생각된다.

다음 ouabain의 효과를 보면 Na-K 펌프를 억제하는 작용은 너무 잘 알려져 있다. 이러한 Na-K 펌프 억제기전이 digitalis의 강심 효과인 것으로 알려지고

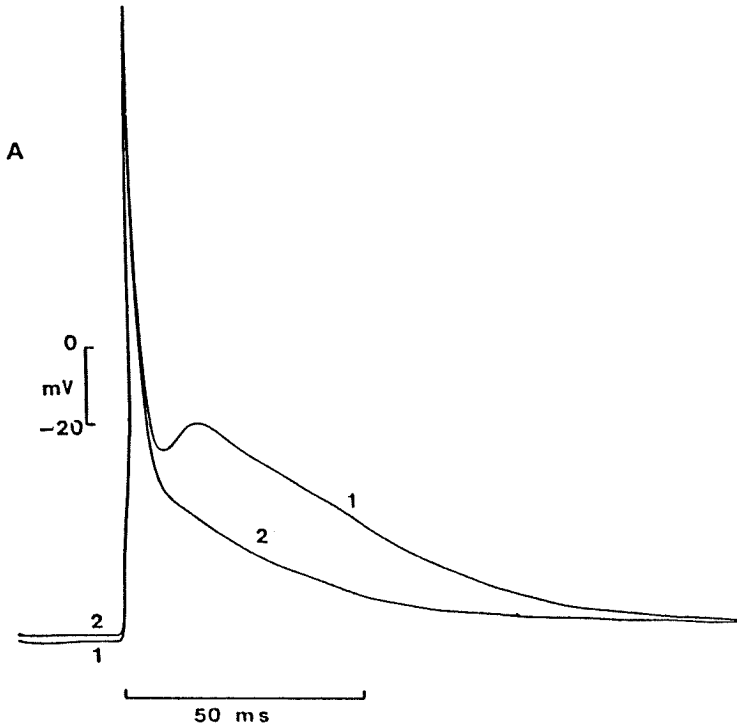


Fig. 7-A. Effects of  $10^{-6}$ M ryanodine on the action potentials and membrane currents in rabbit atrial and ventricular cells.

(A) : Superimposed action potential records in normal (1) and ryanodine (2) containing Tyrode solution in rabbit atrial cells. Ryanodine suppressed the late phase of repolarization.

있다. Na-K 펌프 억제시 세포내  $\text{Na}^+$  농도가 증가하고 또 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도가 증가하며 수축력이 커진다<sup>25)</sup>. 이와같은 현상들은 Na-Ca 교환기전의 작용을 통해서 설명이 가능하다. 즉 Na-K 펌프가 억제되면 세포내  $\text{Na}^+$  농도가 올라가고 그 결과 Na-경사가 변화하여  $\text{Na}^+$ 이 세포밖으로 이동하고  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포내로 이동하는 Na-Ca 교환기전이 작동한다. 그결과 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 이 증가하여 수축단백과 결합하여 수축력이 증가하는 기전이 바로 digitalis의 강심효과라고 설명되고 있다<sup>26)</sup>. 따라서 ouabain은 Na-Ca 교환기전을  $\text{Na}^+$ 이 밖으로 그리고  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포내로 이동하는 방향 즉 외향전류 방향으로 작동시킨다. 외향방향의 Na-Ca 교환기전은 정상 활동전압의 후반부 plateau를 일으키는 것으로 믿어지는 Na-Ca 교환기전의 내향전류를 감소 상쇄시켜 후반부 plateau가 감소 혹은 소실될 것<sup>27)</sup>으로 예상된다. 본실험결과는 이와같은 예상에 잘 부합되는 결과를 얻었다. 마찬가지로 막전

압조정 실험결과를 보면 ouabain에 의하여 막전류가 외향방향으로 이동됨을 보인다. 이같은 결과는 활동전압에 대한 효과를 설명해 줄 수 있다. 그러나 30% Na의 경우에서와 마찬가지로 Na-전류도 감소시켰기 때문에 ouabain에 의한 활동전압 기간의 단축 및 막전류의 변화를 모두 Na-Ca교환기전에 의한 것으로 볼수는 없을 것 같다.

30% Na이나 ouabain의 경우나 마찬가지로 ryanodine 또한 비슷한 효과를 보였다. 토끼 심방근 세포의 활동전압에서는 후반부 plateau를 현저히 감소시켰고 막전류 또한 외향방향으로 이동시켰다. 그리고 토끼 심실근의 경우에는 활동전압의 plateau를 줄여 기간이 현저히 단축되었다. 이와같은 결과는 ryanodine이 세포내 저장고로부터  $\text{Ca}^{2+}$ 이 유리되는 기전을 억제한다는 사실<sup>28)</sup>로 설명이 가능할 것 같다. 세포내 저장고는 세포막을 통한 Ca-전류에 의하여 regenerative하게  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시켜 근육수축을

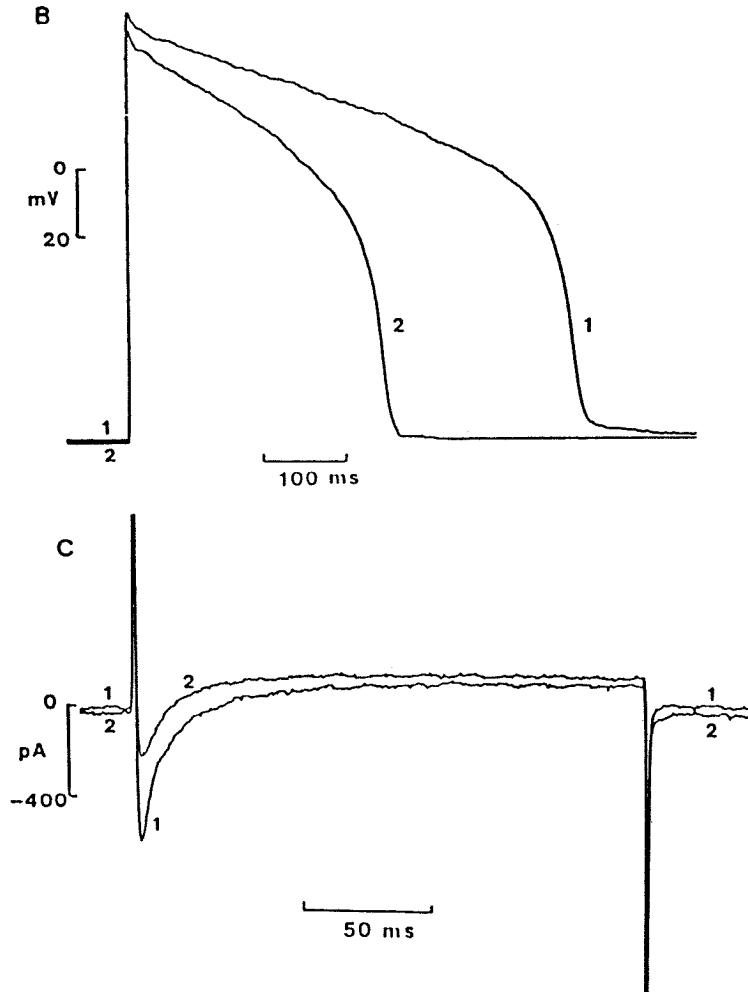


Fig. 7-B.C. (B) : Superimposed records of action potentials in normal (1) and ryanodine in rabbit ventricular cells. Ryanodine decreased the plateau and duration of action potential.

(C) : Superimposed records of membrane currents in normal (1) and ryanodine (2). Ryanodine reduced Ca-current and shifted the late current to the outward direction.

일으킨다. 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도증가는 Na-Ca 교환기전을  $\text{Na}^+$  은 세포내로,  $\text{Ca}^{2+}$  은 세포밖으로 이동시키는 내향전류를 이루게 되고 바로 이 내향전류에 의하여 활동전압의 후반부 plateau가 유지되는 것으로 생각할 수 있겠다. 따라서 ryanodine에 의하여 세포내 Ca-저장고로부터 Ca-유리가 억제되면 결국 Na-Ca 교환기전의 내향전류가 일어나지 않게되어 본 실험에서와 같은 변화를 일으킬 것으로 믿어진다.

본실험에서 사용한 심근 세포의 활동전압중 후반

부 plateau는 Na-Ca 교환기전에 의한 내향전류에 의한 것으로 생각할 수 있으나 동물의 종이나 부위에 따른 활동전압 모양의 차이가 모두 Na-Ca 교환기전과 관계가 있는지는 앞으로 좀더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 결 론

심근 활동전압에 대한 Na-Ca 교환기전의 역할을

밝히기 위하여 guinea-pig 심방근, 토끼 심방근 및 심실근의 단일세포에서 whole cell patch clamp 및 internal perfusion 방법을 사용하여 활동전압 및 막전류를 기록하였다. Na-Ca 교환기전에 영향을 주는 인자들 즉 자극빈도, 세포내  $\text{Na}^+$  농도, 세포밖  $\text{Na}^+$  농도, Ca-저장고로부터의  $\text{Ca}^{2+}$  유리기전등에 변화를 일으키는 조건을 가하여 각 조건하에서 활동전압의 변화를 관찰하고 동시에 막전압 고정실험을 하여 막전류의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 세포내  $\text{Na}^+$  농도를 0mM로부터, 10, 20mM로 증가시켰을때 심실근 활동전압의 기전은 농도 의존적으로 현저하게 단축되었다.

2) 관류용액의  $\text{Na}^+$  농도를 30%로 감소시켰을때 (나머지는  $\text{Li}^+$ 으로 대체) 심방근 활동전압 기간은 단축되었고 막전압 고정실험 결과 Ca-전류의 감소, 외향전류의 증가등이 나타났다. 특히 활동전압의 변화는 후반부 plateau 부분이 현저하게 나타나는 토끼 심방근에서 감소현상이 뚜렷하였다.

3) 세포내액을  $\text{K}^+$  대신  $\text{Cs}^+$ 으로 대체하고 막전류를 기록하였을때 30%  $\text{Na}$ 는 여전히 Ca-전류의 감소 및 느린외향 전류의 증가(혹은 내향전류의 감소)가 나타났다.

4) Na-펌프 억제제인  $10^{-5}\text{M}$ 의 ouabain을 투여했을때 활동전압의 기간을 현저하게 단축시켰고 막전류 기록에서 보면 유지전류를 외향방향으로 이동시키고 Ca-전류를 감소시켰으며 느린 내향전류가 외향전류로 변화하였다.

5) 세포내 Ca-저장고로부터 Ca-유리를 억제하는 효과를 가진 ryanodine  $10^{-6}\text{M}$ 을 처리하였을때 토끼 심방근의 활동전압의 후반부 plateau가 소실되었고 토끼 심실근에서는 활동전압의 기간을 단축시켰으며 막전류기록에서는 Ca-전류의 감소 및 느린 외향전류의 증가를 보였다.

이상의 결과를 종합하면 Na-Ca 교환기전에 영향을 주는 세포내  $\text{Na}^+$  농도증가, 세포외  $\text{Na}^+$  농도감소(30% Na), ouabain, ryanodine은 모두  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 감소 및 느린 내향전류의 감소를 초래하여 활동전압 기간의 단축 및 후반부 plateau를 감소시키는 효과를 보였으며 특히 느린 내향전류성분은 Na-Ca 교환기전에 의한 내향전류라고 생각되고 이것이 활동전압

후반부 plateau를 이루는 성분으로 결론 지을 수 있다.

## References

- 1) Niedergerke R and Orkand RK : *The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart.* J Physiol 184 : 291, 1966
- 2) Di Francesco D and Noble DA : *Model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes.* Phil Trans Roy Soc B 307 : 353, 1985
- 3) Isenberg G and Klockner U : *Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude.* Pflügers Arch 395 : 30, 1982
- 4) Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW : *Strontium nifedipine and 4-aminopyridine modify the time course of the action potential in cells from rat ventricular muscle.* Br J Pharmacol 81 : 551, 1989
- 5) Hume JR and Uebara A : *Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes.* J Physiol 368 : 525, 1985
- 6) Kass RS and Wieggers SE : *The ionic basis of concentration-related effects of noradrenaline on the action potential of calf cardiac Purkinje fibres.* J Physiol 322 : 541-558, 1982
- 7) Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW : *Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle.* Proc Roy Soc B 219 : 447, 1983
- 8) Kimura J, Noma A and Irisawa H : *Na-Ca exchange current in mam-malian heart cells.* Nature 319 : 596, 1986
- 9) Colquhoun D, Neher E, Reuter H and Stevens CF : *Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured heart cells.* Nature 294 : 752, 1981
- 10) Reuter H and Seitz N : *The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external composition.* J Physiol 195 : 451, 1968

- 11) Glitsch HG, Reuter H and Scholz H : *The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guineapig auricles.* *J Physiol* 209 : 25, 1970
- 12) Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, et al : *The influence of calcium on sodium efflux in squid axons.* *J Physiol* 200 : 431, 1969
- 13) Baker PF and Blaustein MP : *Sodium-dependent uptake of calcium by crab nerve.* *Bioch Biophys Acta* 150 : 167, 1968
- 14) Campbell AK : *Intracellular calcium.* Chichester, Willy 1983
- 15) Blaustein MP and Hodgkin AL : *The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons.* *J Physiol* 200 : 497, 1969
- 16) Dipolo R and Beauge L : *The calcium pump and sodium-calcium exchange in squid axons.* *Ann Rev Physiol* 45 : 313, 1983
- 17) Phillipson KD : *Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles.* *Ann Rev Physiol* 47 : 561, 1985
- 18) Langer GA : *Sodium-calcium exchange in the heart.* *Ann Rev Physiol* 44 : 435, 1982
- 19) Eisner DA and Lederer WJ : *Na-Ca exchange : Stodichimetry and electrogenicity.* *Am J Physiol* 248 : C189, 1985
- 20) Matsuda H and Noma A : *Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea-pig.* *J Physiol* 357 : 553, 1989
- 21) Hilgemann DW and Noble D : *Calcium movements during cardiac electrical activity : correlation of net fluxes with currents.* *Proceedings of Banff Satellite Symposium. IUPS 1986.* Alan Liss 1987
- 22) Sutko JL, Willerson JT, Templeton, et al : *Ryanodine : Its alterations of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action.* *J Pharmacol Exp Ther* 209 : 37, 1979
- 23) Lee KS, Marban E and Tsien RW : *Inactivation of calcium channels in mammalian heart cell : joint dependence on membrane potential and intracellular calcium.* *J Physiol* 364 : 359, 1985
- 24) Mullins LJ : *The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange.* *Am J Physiol* 236 : C103, 1979
- 25) Lee CO and Dagostino M : *Effect of strychnine on intracellular Na ion activity and twitch tension of constantly driven canine cardiac purkinje fibers.* *Biophys J* 40 : 185, 1982
- 26) Allen DG, Eisner DA and Wray SC : *Sodium pump : Birthday present for digitalis.* *Nature* 316 : 647, 1985
- 27) Hilgemann DW : *Extracellular calcium transients and action potential configuration changes related to post-stimulatory potentiation in rabbit atrium.* *J Gen Physiol* 87 : 675, 1986
- 28) Suko JL and Willerson JT : *Ryanodine alteration of the contractile state of rat ventricular myocardium. Comparison with dog, cat and rabbit ventricular tissues.* *Circ Res* 46 : 332, 1980