

내피세포 유래 이완인자들이 심장근의 ATP-민감성 칼륨통로의 활성조절에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 약리학교실,¹ 생리학교실,² 내과학교실,³
전남대학교 수의과대학 약리학교실⁴

주정민¹ · 신동호⁴ · 정한성² · 박형욱³ · 조정관³ · 김재하¹

Effects of Endothelium-derived Relaxing Factors on the Regulation of ATP-sensitive Potassium Channel Activity in Cardiac Myocytes

Jeong-Min Ju, DVM¹, Dong-Ho Shin, DVM⁴, Han-Seong Jeong, MD²,
Hyung-Wook Park, MD³, Jeong-Gwan Cho, MD³ and Jae-Ha Kim, MD¹

¹Department of Pharmacology, ²Physiology and ³Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, ⁴Department of Pharmacology, Chonnam National University College of Veterinary Medicine, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background and objectives : Effects of the three major endothelium-derived relaxing factors (EDRFs), namely nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI₂), and 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid (EET) on the ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP} channel) activity were examined in isolated cardiac ventricular myocytes. **Materials and Methods** : K_{ATP} channel activities were measured in the enzymatically (collagenase) isolated single mouse ventricular myocytes using excised inside-out, cell-attached, and perforated whole-cell patch clamp techniques. **Results** : In inside-out patches, NO donors, SNP and spermine NONOate, did not affect the K_{ATP} channel activity. In the presence of both ATP and ADP in the bath solution, the NO donors attenuated the activity of the K_{ATP} channel. In cell-attached patches, the NO donors potentiated pinacidil-induced K_{ATP} channel activity. In perforated whole-cell patch configuration, the NO donors decreased the K_{ATP} current induced by PCO 400, a K_{ATP} channel opener. PGI₂ did not affect the K_{ATP} channel activity in excised inside-out patch. However, in the presence of ATP in the internal solution, PGI₂ increased the channel activity in a dose-dependent manner. In cell-attached patches, PGI₂ did not only affect the channel activity itself, but also the dinitrophenol-induced K_{ATP} channel activity. 11, 12-EET had no effect on K_{ATP} channel activities. **Conclusion** : These results indicate that some of the endothelium-derived relaxing factors (nitric oxide and prostacyclin) are involved in the regulation of ATP-sensitive potassium channel activities in mouse ventricular myocytes ; and the regulation type was complicated, activation or inhibition, depending on the cellular environment. (Korean Circulation J 2003;33(5):420-430)

KEY WORDS : ATP-sensitive potassium channel ; Myocytes cardiac ; Endothelium-derived relaxing factor ; Patch clamp techniques.

논문접수일 : 2003년 1월 2일

수정논문접수일 : 2003년 2월 10일

심사완료일 : 2003년 3월 22일

교신저자 : 김재하, 501-746 광주광역시 동구 학동 5 전남대학교 의과대학 약리학교실

전화 : (062) 220-4233 · 전송 : (062) 232-6974 · E-mail : kimjh@chonnam.ac.kr

서 론

ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)는 여러 종(species)의 동물 세포에서 세포내 adenosine triphosphate(ATP)의 농도 또는 ATP/adenosine diphosphate(ADP)비의 변동에 의하여 그 활성이 조절되고 있음이 잘 알려져 있으며^{1,2)} 주로 혈관평활근의 막전위 및 긴장도를 조절³⁾하거나 췌장의 β 세포에서의 인슐린분비⁵⁾에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. K_{ATP} 통로는 정상상태에서는 닫혀 있다가 허혈상태 또는 대사 억제가 일어나는 과부하 상태가 되면 세포내의 ATP의 농도가 어느 한계점이하로 감소하거나 또는 세포내의 ATP/ADP 농도의 비가 낮아져 K_{ATP} 통로 활성이 증가하게 된다.⁶⁾ 이 통로가 활성화되면 세포외로 칼륨이온 배출(K^+ efflux)이 촉진되어, 결과적으로 탈분극후 재분극시까지의 활동전위기간이 단축됨으로써 허혈심근의 수축을 억제하여 과부하로부터의 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 그러나 심근 허혈 때와 같은 과부하상태에서 K_{ATP} 통로가 활성화 되면 칼륨이온의 세포밖 축적을 일으키고 이로 인한 세포막의 탈분극은 활동전위 기간과 불응기의 국부적인 차이를 일으켜서 결과적으로 부정맥 발생의 한 원인이 된다고 알려져 있다.⁸⁾ 즉, 병태생리학적 측면에서 보면 K_{ATP} 통로활성 증가는 허혈시의 심혈관계 세포의 활동전위기간 단축에 의한 심근 수축력 감소,⁹⁾ 혈관확장¹⁰⁾ 등의 긍정적인 면과 막전위의 탈분극에 의한 부정맥 발생의 부정적인 면이 동시에 존재하고 있다. 따라서 많은 연구자들이 이 이온통로의 활성도를 직접 또는 간접적으로 조절하는 약물에 관심을 갖게 되었고 이 K_{ATP} 통로의 기능과 활성 조절기전을 규명하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

대표적인 내피세포 유래 이완 인자(endothelium-derived relaxing factor : EDRF)인 nitric oxide(NO)는 이차전령물질로서, 포유동물세포에서 생산되어 세포내에서 작용하거나 세포막을 통하여 쉽게 확산되어 인접 세포에 작용한다. 특히 신경전달, 뇌혈류 조절, 혈관이완, 혈소판 응고억제 등에 있어서 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다.¹¹⁾ NO는 NO synthases(NOS)에 의해서 L-arginine으로부터 세포질이나 미토콘드리아에서 합성되며 시냅스 소포에 저장되지 않고 곧바로 방출된다.

NO의 일반적인 작용기전은 heme 그룹을 가지고 있

는 guanylate cyclase에 NO가 결합하여 이 효소를 활성화시키고, 활성화된 효소는 세포내 cyclic guanylyl monophosphate(cGMP)농도를 증가시키며, cGMP는 목표단백질에 작용하거나 또는 cGMP-dependent kinase를 활성화시켜 세포내 여러 단백질의 인산화를 통해 작용한다고 알려져 있다.¹²⁾

심혈관계에는 세가지 종류의 NO합성효소(nitric oxide synthase : nNOS, iNOS, eNOS)가 발현되어있는 것으로 보고되고 있는데 nNOS는 SA node나 AV node의 ganglionic fiber 및 근형질세망에 존재하고, iNOS는 심근세포와 관상동맥평활근에 존재하며, eNOS는 혈관이나 심장내피세포에 존재하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾

근래의 연구에 의하면 NO가 심장에서 무스카린성 콜린성 수용체 또는 β -수용체에 의해서 중개되는 전압의 존성 칼슘전류와 수축력, 박동수 조절에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 최근의 연구에 의하면 심근허혈시 NO의 농도가 급격히 상승하여 관상동맥 긴장도를 조절하고 허혈의 정도를 감소시킨다고 한다.¹⁵⁾ Han 등¹⁶⁾은 토끼 심장세포에서 NO donor가 K_{ATP} 통로활성을 증가시키고 이 효과는 cGMP 의존적이라고 하였으나, Moncada 등¹⁷⁾은 기니픽의 심장세포에서 NO가 K_{ATP} 통로에 직접적으로 작용함을 보여 주었다. Shinbo와 Iijima¹⁸⁾는 기니픽의 심장세포에서 K_{ATP} 통로에 대한 NO donor의 효과가 cGMP가 아닌 세포내의 또 다른 매개체에 기인한 것이라고 하였다. 그러나 Tsuura 등¹⁹⁾은 흰쥐의 심실근세포에서 NO가 K_{ATP} 통로활성에 전혀 영향을 미치지 않았다고 하였다. 이와같은 연구결과들은 심장의 내피세포에서 유리되는 NO가 심근세포막에 존재하는 K_{ATP} 통로 활성조절에 있어서 어떤 역할을 할 것으로 생각되지만 이에 대한 연구는 아직 미흡하며 보고자마다 차이를 보이고 있다.

Prostacyclin는 맨처음 발견된 내피세포유래 혈관이완인자로서 shear stress나 thrombin, acetylcholine과 같은 약물에 의해서 내피세포에서 생성되어 유리된다고 알려져 있다.²⁰⁾ Prostacyclin도 K_{ATP} 통로에 영향을 미친다는 보고가 있는 데, Bouchard 등²¹⁾은 Langendorff heart에서 prostaglandin E_2 , I_2 , D_2 가 K_{ATP} 통로를 활성화시킨다는 보고를 하였고, 또한 Jackson 등²²⁾은 토끼 심장에서 prostacyclin이 혈관이완을 일으키는 데 이 효과가 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 부분적으로 억제됨을 보고한 바 있다. 이런 연구 결과들

은 모두 다 prostacyclin과 K_{ATP} 통로와의 관련성을 시사하는 보고들이다.

Epoxyeicosatrienoic acid(EET)은 arachidonic acid로부터 cytochrome P450에 의한 대사산물이며 내피세포 유래 과분극 인자 (EDHF)로 추정되고 있다.²³⁾ 관상동맥 평활근을 이완시키고 뇌, 신장, 관상동맥 평활근세포에서 Ca^{2+} -의존성 칼륨통로를 활성화시킨다는 사실이 보고되고 있다.²⁴⁾ 한편, 심장에서 EET는 심근세포를 수축시키고 세포내의 칼슘농도를 증가시킨다고 하였다.²⁵⁾

이와같은 사실로 미루어 심장의 내피세포에서 유리되는 이완물질들이 심근세포막에 존재하는 K_{ATP} 통로 활성 조절에 있어서 어떤 역할을 하리라고 생각되지만 이에 대한 연구는 아직 미미한 편이다. 따라서 본 연구에서는 효소분리법으로 분리한 마우스의 단일 심실근세포에서 대표적인 EDRF인 NO, prostacyclin, EET가 K_{ATP} 통로 활성 조절에 어떻게 영향을 미치는 가를 전기생리학적 방법으로 구명해 보고자 하였다.

재료 및 방법

단일심실근세포의 분리

Patch clamp 실험에 사용할 단일 심실근세포의 분리는 체중 25g 내외의 ICR계의 수컷 마우스를 사용하였다. 마우스를 경추탈구법으로 실신시킨 후, 흉강을 열고 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 4°C 100% 산소로 포화된 Tyrode 용액 내에서 미세가위를 가지고 실체현미경(OAM 24SR, 동원) 하에서 주변연결조직과 지방조직을 제거하고 대동맥에 catheter를 삽입한 후 절찰하였다. Langendorff 장치에 매달고 37°C Tyrode 용액을 관상동맥을 통해 1.5 mL/min의 속도로 5분간 관류시켰다. 이어서 심장박동이 멈출 때까지 Ca^{2+} -free Tyrode 용액으로 관류시키고 심장이 완전히 이완되면 0.6 mg/mL의 collagenase(CLS2, Worthington Biochemical Co.)와 0.15 mg/mL의 protease(Sigma type XIV)를 함유한 Ca^{2+} free Tyrode 용액으로 약 25분간 관류시킨 다음, 마지막으로 high K^+ , low Cl^- 용액을 5분간 관류시켜 심장내에 남아있는 효소를 제거시켰다. 소화된 심장으로부터 심실을 떼어내어 high K^+ , low Cl^- 용액에 넣고 여러 조각으로 자른 다음 pipette으로 가볍게 기계적 자극을 주어 단일 심실근세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 high K^+ , low Cl^- 용액에 보관한 후 도립현미경

(American Optical Co.) 상에서 막대기모양의 무늬가 분명하며 윤곽이 뚜렷하고 움직임이 없는 세포들만 골라 실험에 사용하였다.

미세전극의 제작

Patch clamp 용 미세전극은 내경 1.5 mm의 borosilicate 유리관(PG150T-7.5, Clark Electromedical Instruments Co.)을 미세전극제작기(2-stage pipette puller, PP-83, Narishige)를 이용하여 단일 통로 활성 기록용은 저항이 4~5 M Ω , whole-cell 전류 측정용은 저항이 1~2 M Ω 정도되게 뽑은 후, 실체현미경(stereozoom microscope, SMZ-2B, Nikon) 하에서 미세전극 말단근처 부위까지 Sylgard(Corning Co.)를 도포후 가열된 니크롬선 하에서 건조시켰다. 이렇게 만들어진 미세전극의 말단을 다시 광학현미경(Microforge, MF-83, Narishige) 하에서 관찰(500배)하면서 전극 말단부에 열을 가하여 다듬은(polishing) 후 저항이 단일통로 활성 기록용은 5~7 M Ω , whole-cell 전류 측정용은 1.5~2.5 M Ω 정도되는 전극을 실험에 사용하였다.

단일통로전류 측정 및 분석

단일통로전류는 gigaohm-seal patch clamp 방법중 excised inside-out과 cell-attached membrane patch 방법²⁶⁾을 사용하여 기록하였다. Patch clamp 증폭기(Axopatch 200A, Axon Instruments Inc.)를 통하여(이때 cut-off frequency는 2 kHz) 측정된 전기적인 신호는 디지털 신호기록기(digital data recorder, VR-10B, Instrutech Co.)를 거쳐 비디오(SV-14D, Samsung)에 기록하였다. 단일통로전류의 분석은 비디오 테이프에 기록된 것을 재생하여 A/D 변환기인 Digidata 1200 interface(Axon Instruments Inc.)에 연결하여 pClamp 프로그램(Axon Instruments Inc.)를 이용하여 컴퓨터에 저장하고 분석하였다. 단일통로의 열리고 닫히는 시간의 측정은 half-maximum single-unit amplitude threshold를 이용하였다. Open probability(P_o)는 Spruce 등²⁷⁾의 방법에 의한 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$P_o = \frac{n}{\sum_{j=1}^n t_j} / (T d n)$$

이 식에서 t_j 는 $j(j=1, 2, \dots, n)$ 개의 통로가 열릴 때 각

각의 전류단계에서의 통로가 열려있는 시간, Td는 단일 통로전류를 기록한 시간, n은 control 상태에서 최대로 활성화되는 통로의 수를 가리킨다. Po는 30초이상의 연속된 단일통로기록들을 사용하여 계산하고, relative open probability는 약물투여전의 Po와 투여후의 Po의 차이를 약물투여전의 Po에 대한 백분율로 표시하였다.

Whole-cell 전류측정 및 분석

Whole cell 전류측정은 amphotericin B(480 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 pipette-용액에 sonication하여 녹인 다음 미세전극 끝부분에 채우고 세포막에 giga-seal을 형성시킨다. 약 15분 정도를 세포막에 통로가 형성되기를 기다리면서 access resistance가 20 M Ω 이하가 되었을 때 -40 mV의 막전압 고정상태에서 대사억제제인 dinitrophenol (50 μM)이나 선택적인 K_{ATP} 통로개구제인 PCO400 (100 μM)을 첨가하여 K_{ATP} 전류를 유도하였다. 측정된 전류 및 전압 신호는 1 kHz의 필터를 거쳐 A/D 변환기로 디지털화하고 컴퓨터상에서 pClamp software로 분석했다.

실험용액

단일 심실근세포 분리를 위한 Tyrode's 용액(조성 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, pH는 NaOH를 사용하여 7.4로 조정)을 사용하였다.

단일 심실근세포 저장에 사용된 high K⁺, low Cl⁻ 용액(조성 : 20 mM taurine, 70 mM glutamic acid, 25 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, KOH로 pH를 7.35로 조정)을 사용하였다.

단일 통로전류 측정을 위한 용액은 internal 용액, pipette 용액 및 bath 용액으로서 각각 K-5용액(조성 : 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA 및 10 mM HEPES, pH는 HCl로 7.2로 조정)을 사용하였다.

Perforated whole-cell 전류측정을 위한 용액은 bath 용액으로는 Tyrode's 용액(조성 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, pH는 NaOH를 사용하여 7.4로 조정)을 사용하였고 pipette 용액은 110 mM K-aspartate, 30 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM MgSO₄, KOH를 이용하여 pH=7.2로

적정하였다.

실험 약물

NO donor로는 spermine NONOate(Tocris, 영국), sodium nitroprusside (SNP : Sigma, 미국), 칼륨통로 개구제는 pinacidil(Sigma, 미국), PCO400(Biomol, 독일), K_{ATP} 통로차단제는 glibenclamide, cGMP analogue는 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate(8-bromo-cGMP), guanylyl cyclase inhibitor는 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4, 3-a] quinoxalin-1-one(ODQ), prostacyclin와 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid(EET), 대사억제제로는 2, 4-dinitrophenol(DNP)을 그밖에 adenosine triphosphate(ATP), adenosine diphosphate(ADP), uridine diphosphate(UDP), amphotericin B(이상 Sigma, 미국) 등을 사용하였다.

통계 분석

실험성적의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 이용하였고 *p*<0.05 일 때를 두 실험군간에 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

K_{ATP} 통로 활성화에 미치는 NO donor의 영향

Excised inside-out patch에서 NO donor의 효과

Excised inside-out patch를 시행한 직후 -60 mV의 유지전위상태에서 bath에 SNP(1 mM)와 spermine NONOate(500 μM)를 관류시켰으나 통로 활성화에 영향을 미치지 않았다. Excised inside-out 시행 직후에는 세포내 ATP가 거의 없는 상태([ATP]_i=0)이므로 K_{ATP} 통로 활성화가 최대로 나타난다. 따라서 통로 활성을 증가시킬 수 있는 약물의 경우 그 효과가 은폐되어 나타나지 않을 수 있다. Excised inside-out patch에서 NO donor가 통로 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 알아보고자 세포내액에 먼저 ATP(100 μM)를 투여해서 통로활성을 약화시킨 다음 여기에 SNP(1 mM) 및 spermine NONOate(500 μM)을 첨가하여 보았으나 역시 통로활성을 증가시키지 않았다.

Nucleotide diphosphate(NDP)가 존재할 때 NO donor가 K_{ATP} 통로 활성화에 어떤 영향을 미치는 가를 알아보

고자 ATP와 NDP 존재하에서 실험을 시행하였다. ATP (200 μ M)를 투여해서 통로 활성을 약화시킨 다음 여기에 ADP(200 μ M) 또는 UDP(3 mM)를 첨가하여 통로를 부분적으로 재활성화시킨 후 SNP(1 mM)와 spermine NONOate(500 μ M)를 투여하였더니 통로 활성이 억제되었다(Fig. 1, 2). 이러한 통로 억제효과는 NO donor를 제거함으로써 없어졌다.

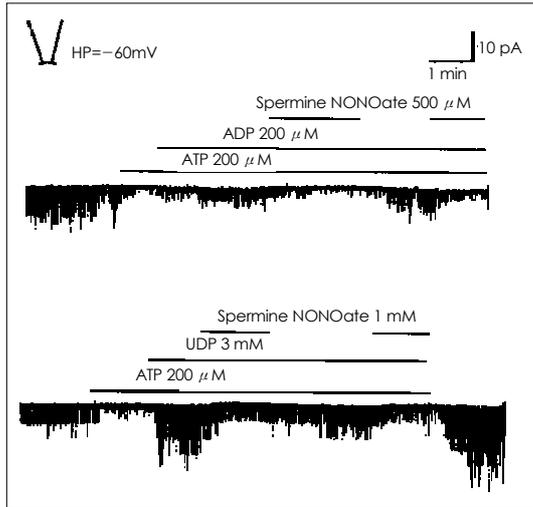


Fig. 1. Effect of spermine NONOate on K_{ATP} channel activity in the presence of both ATP and NDP in excised inside-out patch at -60 mV holding potential. K_{ATP} channels reactivated by ADP (200 μ M) or UDP (3 mM) were decreased by spermine NONOate.

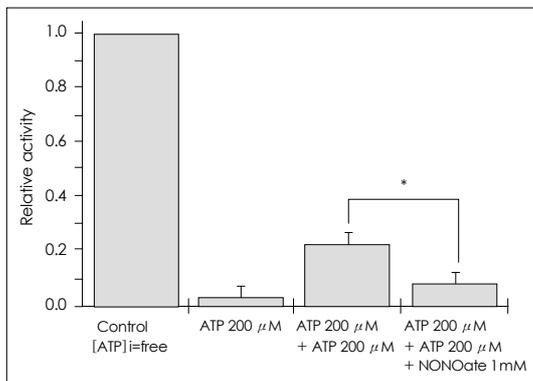


Fig. 2. Effects of spermine NONOate on the K_{ATP} channel activity of excised inside-out patch at -60 mV holding potential in the presence of both ATP and ADP in bath solution. Relative activity represents the channel activity at immediately after making excised inside-out patch. Each bar represents the mean \pm S.E. of four experiments. * : indicates significant differences at $p < 0.05$, compared with 200 μ M ATP + 200 μ M ADP group. ADP : adenosine diphosphate, ATP : adenosine triphosphate

Perforated whole cell patch에서 NO donor의 효과

NO donor가 K_{ATP} 전류에 미치는 영향을 알아보기 위하여 perforated whole cell 상태에서 K_{ATP} 전류를 유도한 다음 세포외액에 SNP(1 mM) 첨가하였을 때 K_{ATP} 전류가 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이와 같이 SNP에 의해서 감소된 K_{ATP} 전류는 세포외액에서 SNP를 제거하고 관류시키면 다시 이전수준으로 환원되었다.

Cell-attached patch에서 NO donor의 효과

Cell-attached patch에서 NO donor가 K_{ATP} 통로 활성에 미치는 영향을 확인하고자 giga-seal을 형성한 후 -60 mV의 유지전위에서 세포외액에 선택적인 ATP-민감성 칼륨통로 개구제인 pinacidil (100 μ M)이나 PCO400 (100 μ M)을 투여하여 통로 활성을 유도하고 여기에 SNP(1 mM)를 첨가하여 통로 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

Pinacidil (100 μ M) 투여후 K_{ATP} 통로활성은 서서히 증가하기 시작하였고 이 때 첨가한 SNP 1 mM은 통로 활성을 더욱 증가시켰다. SNP는 수용액속에서 CN^- 를 유리한다는 보고²⁸⁾가 있고 CN^- 은 K_{ATP} 통로를 활성화시킬 수 있기 때문에 NO의 직접적인 효과가 가려지고 CN^- 효과가 나타날 수 있다. 따라서 다른 NO donor인 Spermine NONOate (500 μ M)를 같은 방법으로 세포외액에 첨가하여 보았다. 마찬가지로 Spermine NONOate는 K_{ATP} 통로 활성을 증가시켰으며 Spermine NONOate를 제거하고 관류시켰을 때는 원래대로 회복됨을 확인

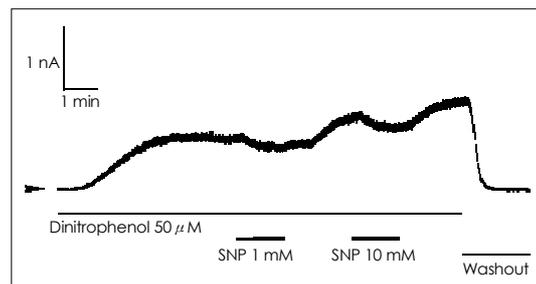


Fig. 3. Effect of SNP (sodium nitroprusside) on K_{ATP} channel current. SNP inhibited the K_{ATP} current induced by 50 μ M dinitrophenol (DNP) in single mouse ventricular myocyte. Cells were held at -40 mV under perforated whole-cell voltage clamp conditions. Bars under current tracing show the protocol of application of drugs and arrow denotes the 0 pA.

할 수 있었다(Fig. 4).

K_{ATP} 통로활성에 영향을 미치는 8-Br-cGMP의 효과

NO donor에 의한 K_{ATP} 통로 활성증가가 세포내 cGMP를 증가시켜서 나타나는 것인지를 확인하기 위하여 세포막을 잘 통과하는 cGMP analogue인 8-Br-cGMP (500 μM)을 cell-attached patch에서 세포외액에 관류시키면서 K_{ATP} 통로 활성을 기록하였으나 통로활성을 증가시키지 못하였다(Fig. 5).

NO donor에 의한 K_{ATP} 통로 활성증가에 미치는 guanylyl cyclase 억제제(ODQ)의 효과

NO donor에 의해 유리된 NO가 심실근세포의 K_{ATP} 통로활성에 미치는 효과가 통로단백질에 대한 직접적인 작용인지 혹은 cGMP를 통하여 간접적으로 나타나는 것인지를 알아보기 위해서 soluble guanylyl cyclase의 선택적 억제제로 cGMP의 생성을 억제하는 ODQ (100 μM)을 세포외액에 투여하였다. 세포외액에 ODQ를 전처치하고 이어서 spermine NONOate (500 μM)를 첨가하였으나 spermine NONOate에 의한 K_{ATP}통로 활성증가는 여전히 나타났다(Fig. 5).

Prostacyclin(PGI₂)이 K_{ATP} 통로 활성에 미치는 영향

Prostacyclin이 K_{ATP} 통로활성에 미치는 영향을 살

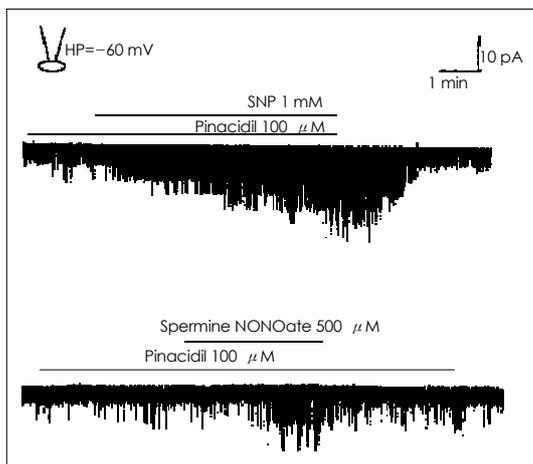


Fig. 4. Effect of sodium nitroprusside (1 mM) and spermine NONOate (500 μM) on the pinacidil-induced K_{ATP} channel activity in the cell-attached patch at -60 mV holding potential. NO donors added to the bath solution potentiated the pinacidil-induced channel activity.

펴보고자 excised inside-out patch 시행후 -60 mV의 유지전위에서 prostacyclin (100 μM)을 세포내액에 첨가하고 통로 활성을 관찰하였으나 K_{ATP} 통로 활성에 영향을 미치지 않았다.

NO의 경우와 마찬가지로 prostacyclin이 K_{ATP}통로 활성을 증가시킬수 있는 가능성을 알아보기로 excised inside-out patch의 세포내액에 ATP (100 μM)를 투여하여 통로활성을 약화시키고 이 상태에서 세포내액에 첨가한 prostacyclin (100 μM)은 통로활성을 증가시켰고 그 결과는 농도의존적이었다(Fig. 6). Prostacyclin은 세포내 ATP 투여에 의해서 K_{ATP} 통로활성이 낮은 상태에서 통로의 활성을 증가시켰으므로 세포내의 여러 용량의 ATP를 투여한 후 다시 prostacyclin 1, 10, 및 100 μM을 각각 세포내측액에 첨가하여 투여하고 통로 활성 정도를 각 용량의 ATP만을 투여했을 시의 통로 활성 정도와 비교하였다. 각 용량의 prostacyclin 첨가시 통로 활성은 ATP만을 투여했을 시의 통로활성에 비해서 증가하였고, 특히 100 μM ATP 투여시 prostacyclin의 통로 활성 증가효과가 현저하였다. 즉, ATP만을 투여하였을 시의 용량-반응곡선은 각 농도의 prostacyclin 투여 후 오른쪽으로 평행 이동하였으며 그 이

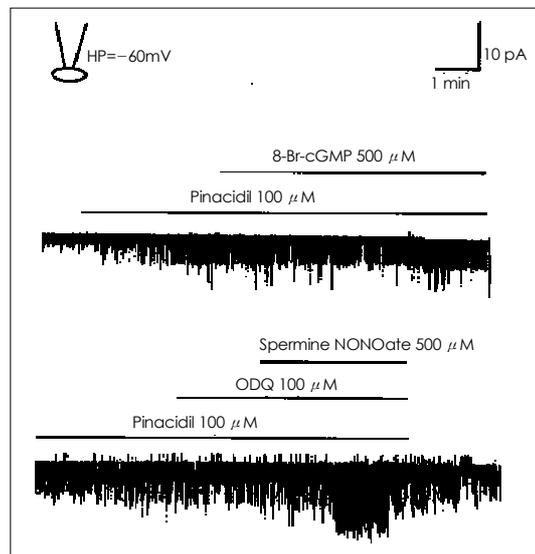


Fig. 5. Effects of 8-Br-cGMP (500 μM) and spermine NONOate (500 μM) on the channel activity in cell-attached patches at -60 mV holding potential. 8-Br-cGMP (500 μM) did not stimulate pinacidil-induced K_{ATP} channel activities but spermine NONOate potentiated the channel activity in the presence of ODQ (100 μM).

동의 정도는 ATP(100 μ M) 투여시 가장 컸다(Fig. 7). Cell attached patch에서 세포외액에 첨가한 prostacyclin(100 μ M)은 통로 활성화에 거의 영향을 주지 못하였을 뿐만 아니라 대사억제제인 dinitrophenol(50 μ M)을 세포외액에 첨가하여 유도한 K_{ATP} 통로 활성화에도 거의 영향을 미치지 않았다(Fig. 8).

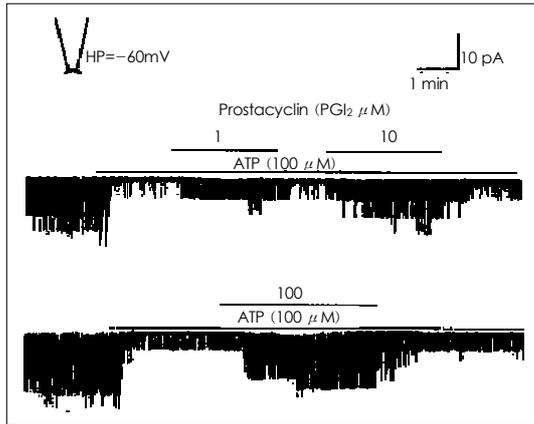


Fig. 6. Effects of prostacyclin on the K_{ATP} channel activity in the presence of internal ATP in inside-out patches at -60 mV holding potential. Prostacyclin (1, 10 and 100 μ M) increased the channel activities which had been attenuated by the addition of 100 μ M ATP to the internal solution.

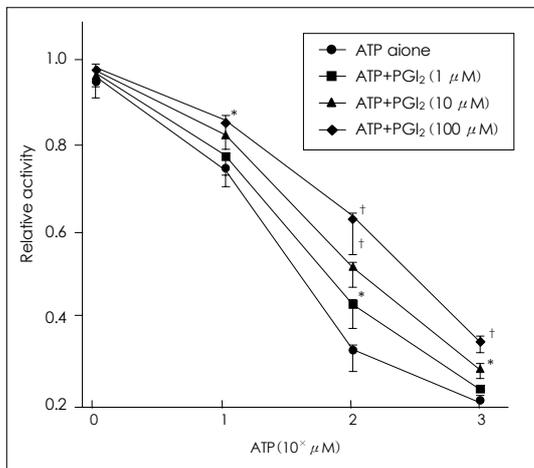


Fig. 7. Effects of prostacyclin on the K_{ATP} channel activity in the presence of ATP in excised inside-out patches. Relative activity of 1.0 represents the channel activity at immediately after making excised inside-out patch. Prostacyclin parallelly shifted the control dose-response curve (ATP alone) to the right. Each point represents mean \pm SEM of 4–5 experiments, and *, † : indicate significant differences compared with ATP alone at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

EET가 K_{ATP} 통로활성에 미치는 영향

Excised inside-out patch에서 EET를 직접 세포내액에 투여하거나 ATP를 투여한 후 통로 활성이 약화된 상태에서 EET를 세포내액에 첨가하여도 통로활성

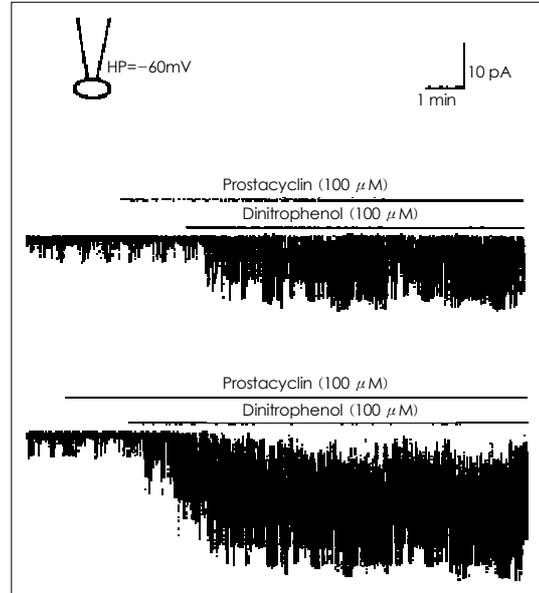


Fig. 8. Effect of prostacyclin (100 μ M) on the channel activity in cell-attached patches. Neither the channel activity nor the dinitrophenol-induced channel activity was changed by 100 μ M prostacyclin.

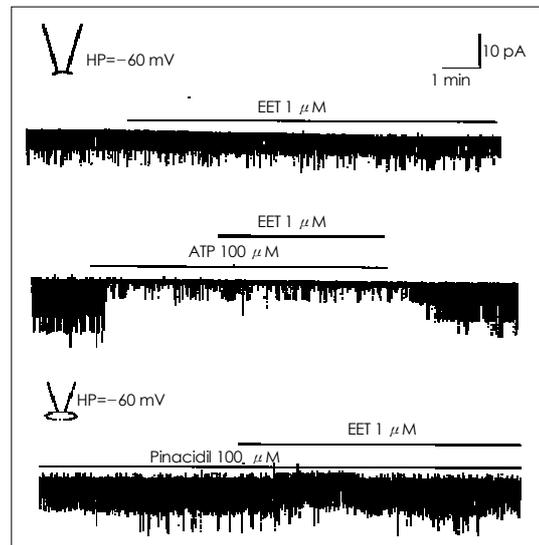


Fig. 9. Effects of 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid (EET) on the K_{ATP} channel activity. EET had no effect on the K_{ATP} channels in excised inside-out patch as well as in cell-attached patch at -60 mV holding potential.

은 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 cell-attached mode에서 EET를 세포밖에 1 μ M농도까지 투여하였으나 K_{ATP} 통로활성에는 영향을 주지 않았다(Fig. 9).

고 찰

본 연구에서는 효소를 처리하여 분리한 마우스의 단일 심실근 세포막에 존재하는 K_{ATP} 통로를 기록하고 이 통로에 미치는 NO, prostacyclin, EET의 영향을 비교해 보았다.

Perforated whole-cell patch에서 NO donor인 SNP와 spermine NONOate은 세포외액에 관류시켰을 때 K_{ATP} 통로활성에 영향을 미치지 않았으나(성적미제시), 대사억제제인 dinitrophenol이나 칼륨통로 개구제(pinacidil 또는 PCO400)에 의해서 유도된 K_{ATP} 통로 전류를 감소시켰다. 또한 excised inside-out patch에서 NO를 단독으로 투여했을 때도 통로활성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 inside-out patch를 시행한 직후에는 세포내 ATP 농도가 이론상 0(zero)이며 따라서 세포막의 K_{ATP} 통로는 최대의 활성을 나타낸다. 따라서 여기에 혈관 이완제와 같이 통로활성을 증가시킬 가능성이 있는 약물을 투여해도 더 이상의 통로 활성 증가는 기대하기 어려운 것으로 추측된다. 따라서 본 실험에서는 NO donor가 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 excised inside-out patch 시행 후 통로 활성이 최대로 나타났을 때 세포내액에 ATP를 투여하여 통로활성을 약화시키고 여기에 NO donor를 투여하여 보았으나 통로활성은 영향을 받지 않았다. 그러나 excised inside-out patch를 시행한 후 ATP로 통로활성을 약화시킨 다음 nucleotide diphosphate(NDP)인 ADP나 UDP를 추가로 첨가하여 통로를 재활성화시킨 후 ATP와 NDP가 존재하는 상황에서 spermine NONOate를 관류시켜 주었을 때 K_{ATP} 통로 활성을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 Inside-out patch를 시행한 후 NDP와 NO donor를 동시에 투여했을 때는 통로활성에 영향을 미치지 못하였다. Cell-attached patch에서 세포외액에 NO donor를 첨가하여 관류시켰을 때 K_{ATP} 통로를 활성화시키지는 못하였으나 칼륨통로 개구제(pinacidil 또는 PCO400)에 의해서 유도된 K_{ATP} 통로 활성의 증가 효과가 세포내 cGMP 농도 증가와 관련이 있는지를 확인하기위해 cGMP analogue인

8-Br-cGMP를 첨가하였으나 K_{ATP} 통로활성 증가효과가 나타나지 않았다. 이러한 연구결과는 다른 연구자의 보고¹⁸⁾와 유사한 결과이다. Cell-attached patch에서 guanylate cyclase 억제제인 ODQ로 전처리한 후 NO donor를 투여했을 때에도 K_{ATP} 통로활성 증가효과는 여전히 나타났다. 현재의 연구만 가지고는 정확히 설명할 수 없지만 지금까지의 실험결과를 종합해보면, NO는 마우스심장의 K_{ATP} 통로 활성을 증가 또는 억제시킬 수 있으며 K_{ATP} 통로 활성 증가 효과는 세포내 cGMP 농도 증가와는 상관없이 나타나는 데 반해 ATP에 의해서 인산화(phosphorylated)된 상태에서 NDP(nucleotide diphosphate)에 의해서 유도된 통로활성이 억제된 점은 통로 단백질의 NDP 결합부위에서 NO와 NDP사이의 상호작용으로 NDP의 민감도를 약화시켜서 상대적으로 ATP의 효과가 다시 나타나기 때문이 아닌가 추측된다. 다시말해서, K_{ATP} 통로에서 ATP 및 NDP가 결합하는 부위는 서로 다른 것으로 알려져 있는데, NO는 인산화된 transducer unit가 아닌 NDP 결합부위에 작용하여 통로단백질을 억제하는 것으로 생각된다. Nucleotide diphosphate가 K_{ATP} 통로활성 조절에 중요한 역할을 한다는 Shen 등²⁹⁾의 보고는 이러한 점에서 본 실험결과와 일치하고 있다. NDP 결합부위에서 약물과 통로활성과의 상호작용에 대한 연구는 아직 미미한 편이고 앞으로 더 추구해봐야 할 것 같다. 또한 perforated whole-cell patch에서 NO가 K_{ATP} 전류를 감소시킨 결과는 다른 연구자들의 보통의 whole cell patch 실험의 결과와도 일치하지 않고 있다. 이러한 차이를 정확하게 설명할 수 없지만 보통의 whole cell patch 방법은 세포막을 인위적으로 크게 터뜨리기 때문에 그 과정에서 pipette에 있는 내용물이 세포내로 흘러들어가(dialysis) 세포내의 여러성분들 특히 효소나 Ca^{2+} , ATP, ADP 등의 농도에 영향을 미쳤을 가능성이 있지만 perforated whole-cell patch에서는 항진균제인 amphotericin B에 의해서 자연스럽게 세포막에 구멍을 만든 다음 실험했기 때문으로 생각된다. NO가 K_{ATP} 통로 활성에 미치는 이중적인 양상은 다른 연구자들의 연구보고에서도 나타나고 있는데 Moncada 등¹⁷⁾에 의하면 NO는 pH가 낮은 상태(6.5-6.0)에서는 K_{ATP} 통로를 억제하지만 정상 pH 상태(7.2~7.4)에서는 K_{ATP} 통로를 증가시키며 이것은 NO가 K_{ATP} 통로에 직접적으로 작용해서 나타난다고 하였다. 또한 Drews 등³⁰⁾은 쥐장의 베타세포에서 NO가 K_{ATP}

통로 활성화에 영향을 미치는데 ATP/ADP 비율을 감소시켜서 통로활성을 증가시키거나 또는 직접적으로 통로 단백질이나 인접한 조절단백질에 작용하여 통로 활성을 억제한다고 하였다.

Prostacyclin은 excised inside-out patch 시행 후 나타나는 K_{ATP} 통로활성에는 거의 영향을 미치지 않았기 때문에 NO의 경우와 마찬가지로 excised inside-out patch 시행 후 세포내액에 ATP를 투여하여 K_{ATP} 통로 활성을 악화시킨 상태에서 prostacyclin을 추가 첨가하였다. 첨가한 prostacyclin은 통로활성을 서서히 증가시켰고 이 증가효과는 prostacyclin을 제거하면 사라졌다. 즉, prostacyclin은 K_{ATP} 통로 활성이 악화된 상태에서 통로활성을 증가시키는 것으로 생각할 수 있다. Cell-attached patch에서 세포외액에 직접 첨가한 prostacyclin이나 대사억제제인 dinitrophenol과 함께 투여한 경우도 excised inside-out patch의 경우와는 달리, 통로활성을 증가시키지 않았다. 이러한 실험결과는 prostacyclin의 통로 활성 증가효과가 세포막의 외부보다는 내부의 어떤 부분에 작용하여 나타난 결과라는 것을 암시한다. 그러나 Langendorff 심장실험에서 세포외액에 관류시킨 prostacyclin이 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킨 점은 prostacyclin이 세포막 외부의 수용체에 작용하였거나 세포내로 들어가서 효과를 냈을 것으로 추측되며 후자의 경우라면 prostacyclin의 세포막투과성이 실험조건에 따라 다를 수 있다. 실제로 Jackson 등²²⁾은 관상동맥 혈관이완실험에서 세포내에서 prostacyclin의 신호전달체계를 담당하고 있는 cAMP가 K_{ATP} 통로활성을 조절하는 데 관여하지 않는다고 주장했다. Prostacyclin의 K_{ATP} 통로 활성 증가효과가 통로단백에 직접 작용하여 나타난 것인지 아니면 이차전령물질과 같은 다른 신호전달체계를 통하여 나타난 것인지는 본 연구의 결과만으로는 알 수 가 없다. 왜냐하면 심실근을 단일 심실근세포로 분리하는 과정에서 사용한 collagenase 효소가 세포막 표면의 수용체를 제거했을 가능성이나 대사억제제에 의해 prostacyclin의 신호전달체계에 이상이 생겼을 가능성을 배제할 수 없기 때문이다.

EET는 이전의 연구자들의 보고에도 불구하고 약물의 효과를 관찰할 수 없었다. 이는 실제로 EET가 마우스의 심장근세포에 존재하는 K_{ATP} 통로 활성화에 영향을 미치지 못했거나 아니면 실험조건(약물의 농도, 동물 등)의 차이로 효과를 관찰하지 못했을 가능성이 있다. 이 부분

은 앞으로 더 추구해봐야 할 일인 것 같다.

결론적으로, 내피세포 유래 이완인자들 중 일부는 허혈과 같은 상태에서 K_{ATP} 통로 활성조절에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 그 양상은 EDRF의 종류에 따라 차이를 보이는 것으로 추론하였다.

요 약

배경 및 목적 :

내피세포유래 이완인자(endothelium-derived relaxing factor)들이 심근세포막의 이온통로에 작용하여 심혈관계의 기능에 영향을 미친다는 사실이 여러 연구자들에 의하여 밝혀져 왔다. 근래의 연구에 의하면 허혈 시 일부의 EDRF가 세포내에서 증가되어 ATP-민감성 칼륨통로 활성조절에 관여하고 있음을 시사하는 증거들이 밝혀지고 있다. 이에 본 연구에서는 효소분리법으로 분리한 마우스의 단일 심실근세포에서 대표적인 EDRF인 NO, prostacyclin, EET가 K_{ATP} 통로 활성조절에 어떻게 영향을 미치는 가를 전기생리학적 방법으로 규명해 보고자 하였다.

방 법 :

K_{ATP} 통로 활성은 효소(collagenase) 분리법으로 분리한 마우스의 단일심실근세포에서 excised inside-out, cell-attached 및 perforated whole-cell patch clamp 방법으로 측정하였다.

결 과 :

Perforated whole cell patch에서 세포밖에 직접투여한 NO donor인 sodium nitroprusside(SNP ; 1 mM)와 spermine NONOate(500 μ M)은 K_{ATP} 전류에 영향을 미치지 않는 반면에 칼륨 통로개구제인 pinacidil 100 μ M)이나 PCO400(100 μ M)에 의해 유도된 K_{ATP} 전류를 억제시켰다. Excised inside-out patch에서 세포내측에 관류시킨 NO donor는 통로활성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 세포내측에 ATP(200 μ M)를 투여한 다음 통로활성을 악화시키고 이어서 ADP(200 μ M) 또는 UDP(3 mM)를 추가로 첨가해서 다시 통로활성을 증가시킨 후, ATP 및 ADP 또는 UDP의 존재하에서 세포내액에 첨가한 SNP(1 mM) 또는 spermine NONOate 500 μ M)는 통로활성을 억제하였다. 세포내측에 투여한 prostacyclin(1~100 μ M)은 K_{ATP} 통로활성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 세포내측에 ATP(200 μ M)

를 투여하여 통로활성을 약화시키고 세포내액에 추가 첨가한 prostacyclin(1, 10, 100 μ M)은 각각 통로활성을 증가시켰고 증가한 정도도 첨가한 prostacyclin의 용량이 많을수록 컸다. Cell-attached patch에서, pinacidil에 의해 유도된 K_{ATP} 통로활성은 SNP(1 mM)와 spermine NONOate(500 μ M)에 의하여 증가되었으며 그 효과는 가역적이었다. cGMP analogue인 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate(8-Br-cGMP) 500 μ M을 세포외액에 첨가시킨 경우에는 통로활성에 영향을 미치지 못하였다. Soluble guanylate cyclase 억제제인 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo[4, 3-a] quinoxalin-1-one(ODQ)는 spermine NONOate에 의한 K_{ATP} 통로 활성 증가효과에 영향을 미치지 않았고 prostacyclin(100 μ M)도 대사억제제인 dinitrophenol을 투여하여 유도시킨 K_{ATP} 통로활성에 영향을 미치지 않았다. 한편 EET는 K_{ATP} 통로활성조절에 영향을 미치지 않았다.

결 론 :

이상의 결과로부터 내피세포-유래 이완인자로 알려진 물질의 일부(산화질소 및 프로스타사이클린)는 생쥐 심실근 세포에서 ATP-민감성 칼륨통로의 활성 조절에 관여하며, 그 조절의 양상은 세포의 조건에 따라 통로의 활성을 증가 또는 억제시키는 양면성을 보인다고 추론하였다.

중심 단어 : ATP-민감성 칼륨통로 ; 심장세포 ; 내피세포유래 이완인자 ; Patch clamp.

■ 감사문

본 연구는 한국과학재단 목지기초연구(2001-1-21400-001-1) 지원으로 수행되었음..

REFERENCES

- Escande D. *The pharmacology of ATP-sensitive K^+ channels in the heart.* *Pflügers Arch* 1989;414 (Suppl 1):S93-8.
- Nichols CG, Lederer WJ. *Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system.* *Am J Physiol* 1991;261:H1675-86.
- Lederer WJ, Nichols CG. *Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K^+ channels in isolated membrane patches.* *J Physiol* 1989;419:193-211.
- Clapp LH, Gurney AM. *ATP-sensitive K^+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells.* *Am J Physiol* 1992;262:H916-20.
- Ashcroft FM. *Adenosine-5'-triphosphate-sensitive potassium channels.* *Annu Rev Neurosci* 1988;11:97-118.
- Noma A, Takano M. *The ATP-sensitive K^+ channel.* *Jpn J Physiol* 1991;41:177-87.
- Lynch JJ Jr, Sanguinetti MC, Kimura S, Bassett AL. *Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium.* *FASEB J* 1992;6:2952-60.
- Antzelevitch C, di Diego JM. *Role of K^+ channel activators in cardiac electrophysiology and arrhythmias.* *Circulation* 1992;85:1627-9.
- Trube G, Hescheler J. *Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches.* *Pflügers Arch* 1984;401:178-84.
- Findlay I. *ATP-sensitive K^+ channels in rat ventricular myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations.* *Pflügers Arch* 1987;410:313-20.
- Suzuki H, Chen G, Yamamoto Y. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF).* *Jpn Circ J* 1992;56:170-4.
- Snyder SH. *Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters.* *Science* 1992;257:494-6.
- Schulz R, Nava E, Moncada S. *Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium.* *Br J Pharmacol* 1992;105:575-80.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. *Control of cardiac muscle function by an endogenous nitric oxide signaling system.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:347-51.
- Hoshida S, Yamashita N, Igarashi J, Nishida M, Hori M, Kamada T, Kuzuya T, Tada M. *Nitric oxide synthase protects the heart against ischemia-reperfusion injury in rabbits.* *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:413-8.
- Han J, Kim N, Kim E, Ho WK, Earm YE. *Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes.* *J Biol Chem* 2001;276:22140-7.
- Moncada GA, Kishi Y, Numano F, Hiraoka M, Sawanobori T. *Effects of acidosis and NO on nicorandil-activated K_{ATP} channels in guinea-pig ventricular myocytes.* *Br J Pharmacol* 2000;131:1097-104.
- Shinbo A, Iijima T. *Potential by nitric oxide of the ATP-sensitive K^+ current induced by K^+ channels openers in guinea-pig ventricular cells.* *Br J Pharmacol* 1997;120:1568-74.
- Tsuura Y, Ishida H, Hayashi S, Sakamoto K, Horie M, Seino Y. *Nitric oxide opens ATP-sensitive K^+ channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells.* *J Gen Physiol* 1994;104:1079-98.
- Myers PR, Guerra R Jr, Harrison DG. *Release of multiple endothelium-derived relaxing factors from porcine coronary arteries.* *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:392-400.
- Bouchard JF, Dumont E, Lamontagne D. *Evidence that prostaglandins I_2 , E_2 , and D_2 may activate ATP-sensitive potassium channels in the isolated rat heart.* *Cardiovasc Res* 1994;28:901-5.
- Jackson WF, König A, Dambacher T, Busse R. *Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels.* *Am J Physiol* 1993;264:H238-43.
- Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. *Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals.* *J Physiol* 1994;481:407-14.
- Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ. *Stereospecific effects of epoxyeico-*

- satrienoic acid on renal vascular tone and K⁺ channel activity. Am J Physiol 1996;270:F822-32.*
- 25) Moffat MP, Ward CA, Bend JR, Mock T, Farhangkhoue P, Karmazyn M. *Effects of epoxyeicosatrienoic acids on isolated hearts and ventricular myocytes. Am J Physiol 1993;264:H1154-60.*
 - 26) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ. *Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch 1981;391:85-100.*
 - 27) Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. *Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature 1985;316:736-8.*
 - 28) Wink DA, Cook JA, Pacelli R, de Graff W, Gamson J, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. *The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. Arch Biochem Biophys 1996;331:241-8.*
 - 29) Shen WK, Tung RT, Machulda MM, Kurachi Y. *Essential role of nucleotide diphosphates in nicorandil-mediated activation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channel: a comparison with pinacidil and lemakalim. Circ Res 1991;69:1152-8.*
 - 30) Drews G, Kramer C, Krippeit-Drews P. *Dual effect of NO on K_{ATP} current of mouse pancreatic β -cells: stimulation by deenergizing mitochondria and inhibition by direct interaction with the channel. Biochim Biophys Acta 2000;1464:62-8.*