1998년 산학연구비 수혜논문 Korean Circulation J 2000;30(12):1589-1601

흰쥐 심근에서 유리 지방산이 세포막 활동전위와 ATP-민감성 칼륨통로 활성에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 내과학교실 순환기내과,[1] 약리학교실,[2] 생리학교실[3]
김재하[2] · 주정민[2] · 박 종[2] · 백영홍[2] · 국 현[2]
정한성[3] · 정명호[1] · 조정관[1] · 박종춘[1] · 강정채[1]

Influences of Free Fatty Acids on Transmembrane Action Potential and ATP-Sensitive Potassium Channel Activity in Rat Myocardium

Jae-Ha Kim, MD[2], Jeong-Min Ju, DVM[2], Jong Park, MD[2], Yung Hong Baik, MD[2], Hyun Kook, MD[2], Han-Seong Jeong, MD[3], Myung Ho Jeong, MD[1], Jeong-Gwan Cho, MD[1], Jong Chun Park, MD[1] and Jung Chaee Kang, MD[1]

[1]Departments of Internal Medicine, [2]Pharmacology and [3]Physiology Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea

ABSTRACT

Background : To evaluate the role of free fatty acids on the ischemic myocardium, influences of various free fatty acids upon transmembrane action potential and ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channel activity were examined in the ventricular myocardium and single cardiac myocytes. **Methods** : K_{ATP} channel activities were measured in the enzymatically (collagenase) isolated single rat ventricular cardiac myocytes by the method of the excised inside-out and the cell-attached patch clamp, and transmembrane action potentials were recorded using the conventional 3M-KCl microelectode techniques in the rat ventricular myocardium. **Results** : Free fatty acids [FFAs ; arachidonic acid (AA), linoleic acid (LA) and lysophosphatidylcholine (LPC)] reduced the K_{ATP} channel activity in a dose-dependent manner in the inside-out patch, and 50%-inhibition concentrations (IC 50) were 88±11.2, 49±12.5, and 188±17.4 μM respectively. Both frequency of channel opening and the mean open-burst duration were markedly decreased, but the amplitude of single channel currents were not changed by the FFAs. AA (50 μM) and LPC (50 μM) did not affect the dinitrophenol (DNP, 50 μM)-induced K_{ATP} channel activity, whereas LA (50 μM) had a tendency to reduce the activity. The channel inhibition effects by 10 μM AA in the inside-out patch were significantly augmented by diclofenac (10 μM), but was not changed by nordihydroguaiaretic acid. FFAs never stimulated K_{ATP} channel activity, even in the inside-out patch where K_{ATP} channel activity reduced in the presence of internal ATP (100 μM). Time for 90% repolarization (APD_{90}) significantly increased during superfusion of the FFAs, to 22 (50 μM AA), 24 (50 μM LA), and 18 (50 μM LPC)% from those of the contol at the time of 10 min superfusion, but the other action potential characteristics were not changed by the FFAs. AA (10 μM) attenuated cromakalim (10 μM)-induced APD_{90} shortening effects. **Conclusion** : It was inferred that FFAs inhibit the K_{ATP} channel activity directly by themselves and/or indirectly by their metabolites in the rat ventricular cardiomyocytes, and therefore, duration of action potential lengthens to be a burden over the ischemic myocardium

교신저자 : 조정관, 501 - 746 광주광역시 동구 학동 8 전남대학교 의과대학 내과학교실 순환기내과
전화 : (062) 220 - 6242 · 전송 : (062) 225 - 8578
E - mail : chojg@unitel.co.kr

accounting for the injury of myocardium at the late stage of ischemia. **(Korean Circulation J 2000;30(12):1589-1601)**

KEY WORDS : Free fatty acids · Action potential · K_{ATP} channel · Rat · Ventricle.

서 론

심근 세포막에는 ATP(adenosine triphosphate) 농도에 의해서 그 활성이 조절되는 칼륨-선택성 이온 통로(K_{ATP} 통로)가 있음이 널리 알려져있다.[1-6] 이 K_{ATP} 통로는, 세포내 ATP의 농도가 정상 수준일 때는 닫혀있다가 허혈 또는 세포내의 대사가 억제되는 상태에서 세포내의 ATP의 농도 또는 ATP/ADP 농도의 비가 어느 한계점이하로 감소하면 열리게 된다. 따라서 이 통로를 통한 칼륨이온(K^+)의 세포외로의 배출(K^+ efflux)이 촉진되고 탈분극후 재분극시까지의 활동전위기간이 단축됨으로써 심근의 수축이 억제되고 과부하 상태에있는 심근세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져있다.[7-12] 심근 허혈시와 같은 과부하상태에서 K_{ATP} 통로 활성이 증가하고 이로 인한 K^+ efflux의 증가는 칼륨이온의 세포밖 축적을 일으킨다. 따라서 세포막전위가 탈분극 쪽으로 증가하면 활동전위 발현의 역치(threshold)가 낮아지고 이로써 허혈성 부정맥이 발생한다고 알려져 있다.[12][13] 병태생리학적인 측면에서 보면 허혈시의 K_{ATP} 통로 활성의 증가는 심혈관계 세포의 활동전위 기간의 단축에 의한 심근 수축력 감소, 혈관확장 등의 과부하로부터 심근을 보호하는 긍정적인 작용과, 막전위의 탈분극화에 의한 부정맥 유발의 부정적인 작용을 동시에 하게된다. 따라서 많은 연구자들이 이 이온통로의 활성도를 직접 또는 간접적으로 조절하는 약물에 관심을 갖게되었고 이 K_{ATP} 통로의 기능과 활성도 조절기전을 구명하기위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

Arachidonic acid로 대표되는 유리 지방산(free fatty acid)은 세포막을 구성하고있는 인지질(phospholipid)로부터 만들어져 세포내로 유리되는 물질로서, 세포내에서 cyclooxygenase 또는 lipoxygenase pathway에 의해서 만들어지는 다양한 종류의 prostaglandin 및 leukotriene의 전구물질이다. 세포막에 가해지는 자극에 의해서 세포막내의 phospholipase A_2가 활성화되면 지질 성분인 phospholipid로부터 arachidonic acid를 비롯한 자유지방산들이 만들어져 세포내로 유리되는데, 허혈이나 대사 억제와 같은 상태가 지속되어 허혈의 후기(late phase)로 접어들게 되면 세포막이 붕괴(degradation) 되면서 유리 지방산들이 대량으로 세포내에 유리되어 여러 가지 해로운 작용을 일으키는 것으로 알려져있다.[14-16] 특히 Kim,[17] Wallert 등[18]은, 허혈시에 세포막의 지질 성분으로부터 유리된 유리 지방산인 arachidonic acid가 K_{ATP} 통로 활성을 억제하고 새로운 형의 외향전류인 arachidonate-activated K^+ 전류를 생성시킨다는 사실을 밝혀내고 이와같은 현상이 허혈시에 나타나는 세포외 K^+ 축적 현상의 원인이 될 수 있음을 시사하였다. 또한 Bouchard 등[19]은 흰쥐의 Langendorff 심장에서 유리 지방산의 세포내 cyclooxygenase 대사산물들인 prostaglandin I_2, E_2 그리고 D_2가 관상동맥 평활근 이완을 일으켜 관상동맥 관류압(coronary perfusion pressure)을 감소시키는데 이러한 효과가 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide에 의해 억제됨을 보고하였고, Zhang 등[20][21]은 흰쥐 대동맥 평활근 실험에서 prostaglandin $F_{2\alpha}$가 혈관 평활근을 수축시키고 이러한 효과가 역시 sulfonylurea 제제인 glibenclamide에 의해서 억제됨을 보고 하였다. 또한 Nielsen-Kudsk와 Thirstrup,[22] Jackson 등[23]도 토끼 심장의 관상동맥 표본에서 prostaglandin $F_{2\alpha}$가 관상동맥 평활근을 수축시키고 sulfonylurea 제제가 이 효과를 억제시켰다고 보고하였다. 이와같은 연구결과들은 유리 지방산 arachidonic acid 또는 그 대사산물들이 K_{ATP} 통로 활성 조절과 관련이 있다는 것을 말해 주고 있으나 이는 주로 심장에서 Langendorff 방법에 의한 관상동맥 관류압 변동을 측정하거나 혈관 평활근 수축력의 변동을 측정하여 추론한 것이 대부분이고 직접적으로 세포막의 K_{ATP} 통로 활성을 측정하여 보고한 예는 거의 없다. 이에 본 연구에서는 효소분리방법으로 얻은 흰쥐의 단일 심실근 세포에서 patch clamp 방법과 적출 흰쥐 심실근 표본에서 관습적인 3M-KCl 미세전극기법을 이용하여 arachidonic acid를 비롯한 몇

가지의 유리 지방산이 허혈 현상과 관련이 있는 K_{ATP} 통로의 활성과 활동전위 특성에 미치는 영향을 조사하여 허혈 심근에서 이들 물질이 어떠한 역할을 할 것인지를 규명하고자 하였다.

방 법

Patch clamp 실험

단일 심실근세포의 분리

체중 250 g 내외의 Sprague Dawley계의 흰쥐로부터 심장을 적출하여 Langendorff 장치에 매달고 37℃의 Krebs-Henseleit 용액(조성 : 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 10 mM HEPES, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM pyruvate, 11 mM dextrose 및 1 mM $CaCl_2$)을 관상동맥을 통해 4 ml/min의 속도로 5분간 관류시킨 후, 심장박동이 멈출 때까지 Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit 용액으로 관류시킨다. 이어서 collagenase(CLS type II, Worthington Biochemical Co.) 0.7 mg/ml을 함유한 Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit 용액으로 약 40분 동안 관류시켜 심장을 분리시킨후 심실근을 떼어내어 1% albumin을 함유한 Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit 용액에 넣고 가볍게 흔들어 단일 심실근세포로 다시 분리하였다. 분리된 단일 세포들은 조각얼음으로 냉각시킨 1% albumin을 함유한 Ca^{2+}-free Krebs-Henseleit 용액에 보관한 후 도립현미경(Inverted microscope, American Optical Co.)상에서 막대기모양의 가로 무늬가 분명하며 윤곽이 뚜렷한 세포들만 골라 실험에 사용하였다. 실험용액(internal, bath 및 pipette)은 140 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA 및 10 mM HE-PES의 조성의 용액으로서 pH는 HCl을 이용하여 7.2로 조정하였다.

미세전극의 제작

Patch clamp 실험용 미세전극은, 내경 1.5 mm의 borosilicate 유리관(#7052, World Precision Instruments Co.)을 미세전극제작기(2-stage pipette puller ; PP-83, Narishige)를 이용하여 저항이 4~5 MΩ 정도되게 뽑은 후, 광학현미경(Stereozoom microscope ; SMZ-2B, Nikon) 하에서 미세전극의 말단근처 부위까지 Sylgard(Corning Co.)로 도포후 건조시켰다. 이렇게 만들어진 미세전극의 말단을 다시 광학현미경(Microforge ; MF-83, Narishige)하에서 열을 가하여 다듬은 후 저항이 5~10 MΩ정도 되는 전극을 실제의 실험에 사용하였다.

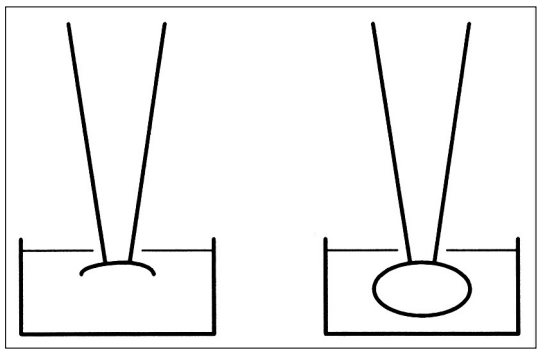

Fig. 1. Patch clamp configurations used in the present study in the single rat ventricular cardiac myocytes. Left : Excised inside-out patch, Right : Cell-attached patch.

단일 통로 전류 측정 및 분석

단일 통로 전류의 측정은 gigaohmseal patch clamp 방법중 excised insideout과 cell-attached membrane patch 방법[24]을 사용하였다(Fig. 1). 측정된 전기적인 신호는 patch clamp 증폭기(Axopatch 200A, Axon Instruments Inc.)를 통하여(cut-off frequency는 2 kHz) PCM(pulse code modulation) 방식의 디지털 신호기록기(digital data recorder ; VR-10B, Instrutech Co.)를 거쳐 비디오 레코더(SV-14D, Samsung)에 기록하였다. 단일 통로 전류의 분석은 비디오테이프에 기록된 신호를 재생하여 A/D converter(Digidata 1200, Axon Instruments Inc.)에 연결하고, pClamp 프로그램(Ver 6.0, Axon Instruments Inc.)을 통해서 컴퓨터의 메모리 장치에 저장한후 분석하였다. 단일 통로의 열리고 닫히는 상태의 변화는 half-maximum singleunit amplitude threshold를 이용하여 측정하였는데, open time과 closed time은 30초이상의 연속된 단일 통로 전류 기록들을 500 Hz의 cut-off frequency(fc)로 filtering한후 계산하였고, leastsquares 분석방법으로 지수 함수적 확률 밀도 함수에 맞추어 fitting하였다. Open probability(Po)는 Spruce 등[25]의 방법에 의한 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$Po=(\sum_{j=1}^{n} tj)/(Td\ n)$$

이 식에서 tj는 j=1, 2,…n개의 통로가 열릴 때 각각의 전류단계에서의 통로가 열려있는 시간, Td는 단일통로 전류를 기록한 시간, n은 control 상태에서 최대로 활성화되는 통로의 수를 가리킨다. Po는 30초이상의 연속된 단일통로 기록들을 사용하여 계산하였고, relative open probability(relative activity)는 약물 투여전의 Po와 투여후의 Po의 차이를 약물 투여전의 Po에 대한 백분율로 표시하거나 excised inside-out patch 시행직후의 open probability를 1로 하고 약물 투여후의 open probability를 상대적으로 비교하여 표시하였다.

Transmembrane 활동전위 측정 실험

심실근 표본의 준비

Patch clamp 실험에 사용된 것과 같은 종류의 흰쥐로부터 심장을 적출하여 좌심실을 분리해 낸 다음 이것을 3×2×1 mm의 절편으로 만들어 Tyrode 액(조성 : NaCl 131 mM, $NaHCO_3$ 18 mM, KCl 5.4 mM, NaH_2PO_4 1.8 mM, $MgCl_2$ 1.0 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, Dextrose 5.5 mM, 95% O_2-5% CO_2 혼합가스를 bubbling시켜 pH=7.4 되게 하고 온도는 유리 열교환기를 이용하여 37℃로 유지)을 7 ml/min의 속도로 관류시킨 bath에 고정한 후 약 1시간이 경과하여 조직이 안정되면 transmembrane 활동전위를 측정하였다.

막전위 측정

Microelectrode puller(Vertical type, Stoelting Co.)를 이용하여 만든 유리 미세전극에 3M의 KCl을 채우고(이때의 전극 DC 저항은 10~30 MΩ) 이것을 micromanipulator(3 axis, Brinkmann)를 이용하여 세포내에 찔러넣은 후 electrometer(S7071A, WPI)를 통하여 오실로스코우프(5113, Tektronix)와 physiological recorder(2400, Gould)에 기록하고 오실로스코프 사진기(C-51, Tektronics)로 촬영한후 측정하였다. 활동전위를 유도하기 위한 표본의 자극은 전기자극기(S48, Grass)에 연결된 bipolar silver electrode(지름 0.1 mm)를 심실근 표본에 접촉시키고 1.5 Hz 주기, 1 msec 기간을 갖는 구형파를 활동전위를 유발할 수 있는 역치 전압의 두배로 전기자극하였다. 활동전위로부터 측정한 변수는, 최대 이완기 전위(maximum diastolic potential ; MDP, mV), 활동전위의 크기(action potential amplitude ; APA, mV), 90% 재분극시의 활동전위 기간(action potential duration ; APD_{90}, msec), 그리고 phase 0 탈분극의 최대 상승속도(dV/dt_{max} ; V/sec) 등이었다. dV/dt_{max}는 electrometer를 거쳐서 나온 막전위의 변동을 differentiator amplifier(실험실에서 제작)에 연결하여 정량화한 다음 오실로스코프상에 기록된 값을 측정하였다(Fig. 2).

실험에 사용한 시약

유리 지방산은 arachidonic acid, linoleic acid, lysophosphatidylcholine 이었고, K_{ATP} 통로 차단제는 glibenclamide, 개구제(opener)는 cromakalim 이었으

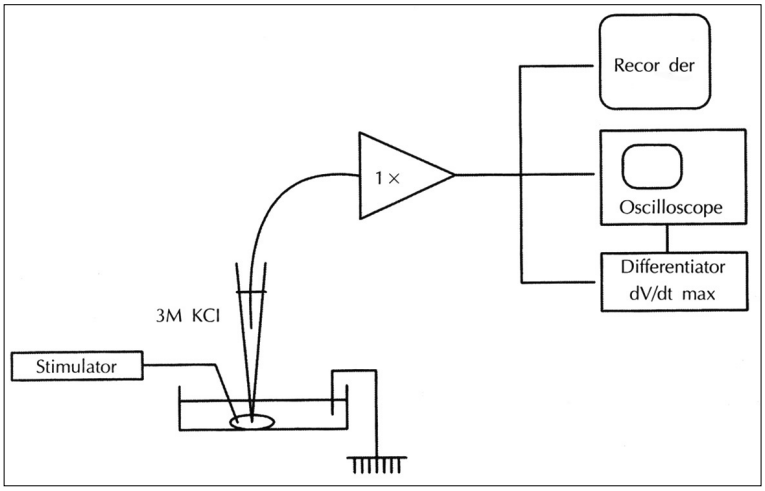

Fig. 2. Schematic diagram of the electrical recording system (conventional 3M-KCl microelectrode technique) for measuring transmembrane action potential in the rat ventricular fibers.

며, cyclooxygenase 억제제는 diclofenac, lipoxygenase 억제제는 nordihydroguaiaretic acid 이었다. 대사억제제로는 dinitrophenol을, 그 밖에 adenosine triphosphate를 사용하였다. 모든 약물은 Sigma chemical company(St. Louis, USA)를 통하여 구입하였으며 유리 지방산은 DMSO에 용해하여 실험 직전에 sonification하여 사용하였고 그 이외의 약물들은 증류수에 고농도의 원액을 만들고 실험 용액으로 희석하여 사용하였다.

실험 성적의 유의성 검증

Stutent's t-test를 이용하였고 $p<0.05$ 일 때를 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

Patch clamp 실험

ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로) 전류의 확인

단일 심실근 세포에서 excised inside-out patch ($[ATP]_i=0$)를 만들고 -60 mV의 유지 전위(holding potential)를 가하면 내향성 전류의 통로 활성이 나타났다. 이어서 세포내액(bath 또는 internal solution)에 ATP 1 mM을 첨가하면 통로 활성이 점차 약화되어 1분 경과시에는 활성이 거의 나타나지 않았다. 세포내액을 ATP가 없는 실험용액으로 교체하면 통로 활성이 다시 나타나기 시작하여 3분 경과시에는 excised inside-out patch 시행직후의 통로 활성과 비슷한 수준을 유지하였고, 이때 세포내액을 K_{ATP} 통로 억제제인 glibenclamide 50 μM을 첨가한 실험용액으로 교체하면 통로 활성이 점차 약화되어 교체후 1분 경부터는 통로 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). 전류-전압 상관관계 곡선은 내향정류성(inward rectification)을 보였으며 slope conductance는 62±1.3 pS(5례)였다. -60 mV 유지전위시의 단일 통로 전류 평균치는 3.7±0.26 pA(5례)였고 한 개의 통로가 열려있는 dwell time과 통로 활성의 정도는 반비례 관계였다. 이상의 통로 특성으로 보아 본 연구의 단일 통로 활성은 ATP-민감성(K_{ATP}) 통로 활성임이 확인되었다. 따로 언급된 경우를 제외하고 본 연구의 patch clamp 실험에서는 -60 mV 유지전위시에 나타나는 내향 전류를 실험 대상으로 하였다(Fig. 4).

Excised inside-out patch의 세포내액에 투여한 유리지방산이 K_{ATP} 통로 활성에 미치는 영향

-60 mV 유지전위시의 excised inside-out patch

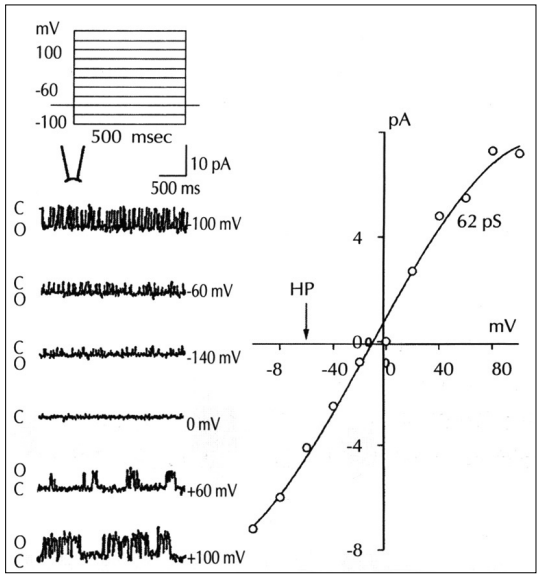

Fig. 4. Current-voltage (I-V) relationship of the K_{ATP} channel activities. Recordings were obtained in the excised inside-out patch at different clamp potentials ranging from -100 to +100 mV (left panel). Current-voltage relationship curve (right panel) was plotted by the single channel currents from the left panel.

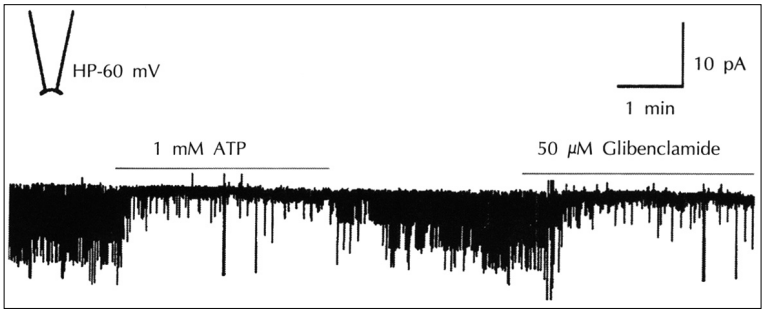

Fig. 3. Representative recording of the typical K_{ATP} channel activity in the excised inside-out patch at -60 mV holding potential. The channel activity appeared immediately after making inside-out patch, and 1 mM ATP almost completely inhibited the channel activity. The channel activity reappeared when the ATP washed out from the bath solution, and then 50 μM glibenclamide inhibited the channel activity again.

의 세포내액에 투여한 arachidonic acid(AA), linoleic acid(LA) 및 lysophosphatidylcholine(LPC)은 K_{ATP} 통로 활성을 용량 의존적으로 억제하였으며, 대부분의 경우에서 지방산 투여후 서서히 통로 활성이 감소하기 시작하여 7~10분이 경과할 즈음에는 최대의 감소를 일으켰다(Fig. 5). 약물의 용량(μM)과 10분 경과시의 통로 활성 억제정도(%) 와의 관계로부터 용량-반응 곡선(Fig. 6)과 각 약물 반응곡선의 회귀선(regression line)을 구하고 이로부터 계산해 낸 50% 통로 활성 억제에 필요한 각 약물의 농도는, AA는 88±11.2, LA는 49±12.5 그리고 LPC는 188±17.4 μM 로서(각각 3~4례) 억제 효력은 LA>AA>LPC의 순이었다. 유리 지방산에 의한 통로 활성 억제의 양상은, 통로열림의 빈도(frequency)와 평균 열림기간(mean open-burst time)은 현저히 감소하였으나 단일 통로 전류의 크기는 변하지 않았다(Fig. 7). Excised inside-out patch에서 유리 지방산을 투여하지 않은 대조군에서의 전류-전압 관계 곡선과 세포내액에 유리 지방산을 투여한 후 5분 경과시의 전류-전압 관계 곡선으로부터 얻은 slope conductance는 각각 62±1.3(대조군), 62±1.4(AA), 61±1.6(LA), 및 62±1.1 pS로서(각 3례) 네 군간에 유의한 차이가 없었다.

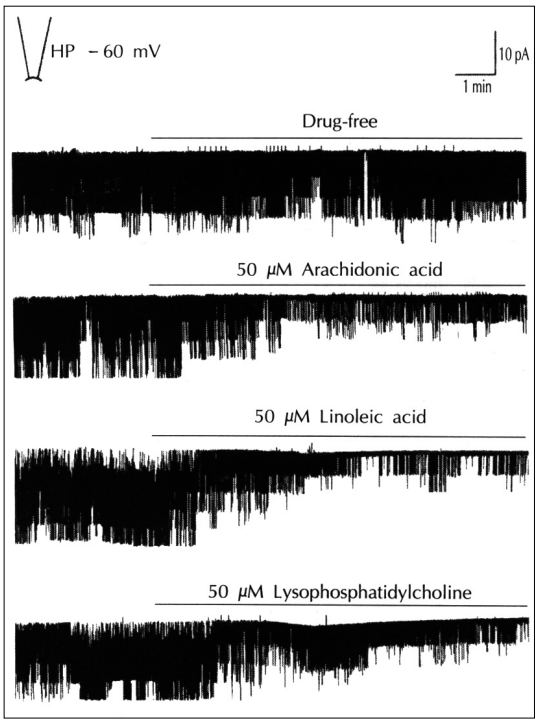

Fig. 5. Effects of free fatty acids (FFAs) on the K_{ATP} channel activities. Recordings are showing that the three FFAs inhibited the channel activities at −60 mV holding potential in the excised inside-out patch.

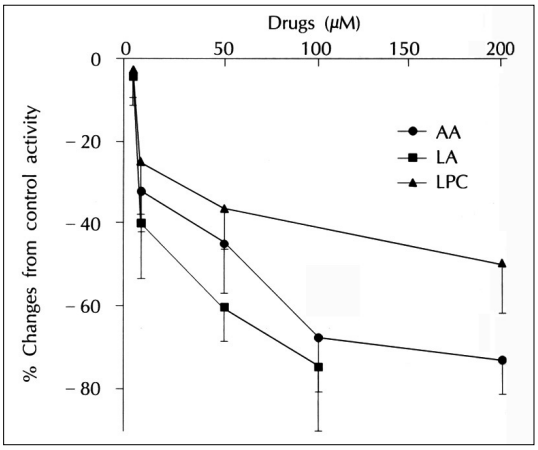

Fig. 6. Dose-response curves of K_{ATP} channel inhibition by the three free fatty acids in the excised inside-out patch. AA : arachidonic acid, LA : linoleic acid, LPC : lysophosphatidylcholine. Each point denotes the mean of 3-4 experiments and the vertical bar is SEM.

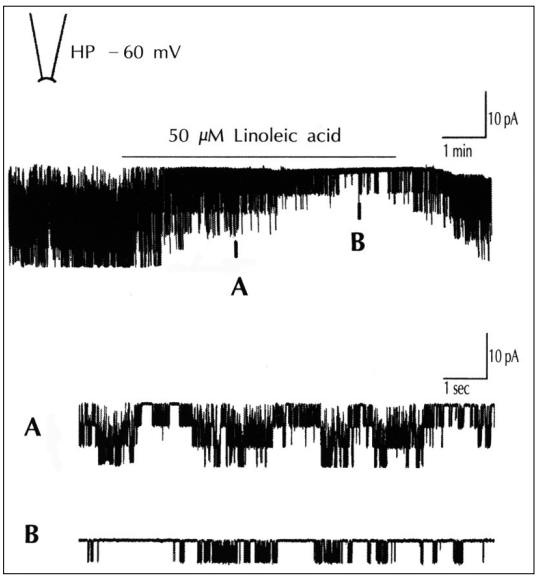

Fig. 7. An aspect of channel inhibition by the linoleic acid (upper trace). Both channel opening frequencies and the mean open-burst durations were markedly decreased as shown by the channel openings at the times marked A and B at expanded scale. Single channel current amplitudes, however, were not affected (lower two traces).

Cyclooxygenase 또는 lipoxygenase 억제제가 유리 지방산의 통로 활성 감소 효과에 미치는 영향

Excised inside-out patch의 세포내액에 투여한 arachidonic acid 10 μM의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과는 cyclooxygenase 억제제인 diclofenac(10 μM)에 의해서 유의하게 증가하였으나($p<0.05$) lipoxygenase 억제제인 nordihydroguaiaretic acid(NDGA, 10 μM)에 의해서는 감소되는 경향을 보였을 뿐 유의한 차이는 없었다. 그러나 linoleic acid 및 lysophosphatidylcholine의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과는 diclofenac(10 μM) 또는 NDGA(10 μM)에 의해서 유의한 영향을 받지않았다(Fig. 8, Table 1).

Cell-attached patch의 bath내에 투여한 유리 지방산이 K_{ATP} 통로 활성에 미치는 영향

Cell-attached patch(-60 mV holding potential)에서 대사억제제인 dinitrophenol(DNP) 50 μM을 bath액에 투여하여 K_{ATP} 통로 활성을 유도하고 여기에 유리 지방산(AA, LA 및 LPC 각 50 μM)을 첨가한 실험용액을 bath에 투여하여 통로 활성에 미치는 영향을 조사하였다. DNP 50 μM 투여후 K_{ATP} 통로 활성은 점차 증가하기 시작하였고 투여후 5~7분이 경과할

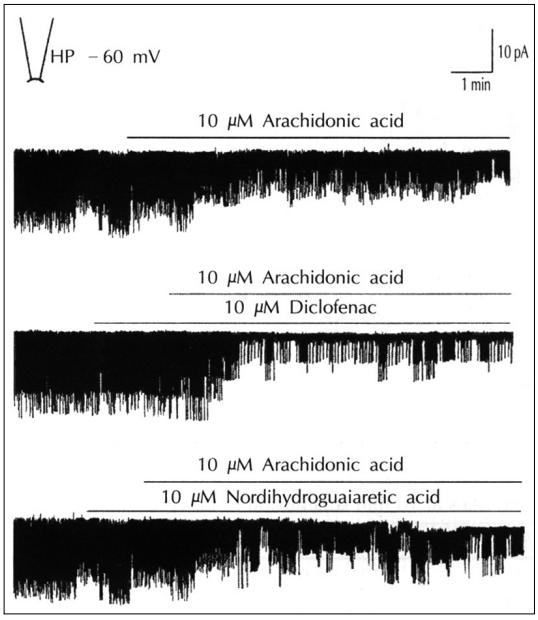

Fig. 8. Influence of diclofenac (a cyclooxygenase inhibitor) and nordihydroguaiaretic acid (a lipoxygenase inhibitor) on the K_{ATP} channel inhibition effect of arachidonic acid (10 μM) in the excised inside-out patch at -60 mV holding potential. The inhibitory effect was augmented significantly in the presence of 10 μM diclofenac, but was not affected by 10 μM nordihydroguaiaretic acid.

Table 1. Influences of cyclooxygenase (Diclofenac) and lipoxygenase (NDGA) inhibitor on the K_{ATP} channel activity inhibition by free fatty acids after 10 min after application in the excised inside-out patch in rat ventricular cardiac myocytes

	Control	Treatments	
		Diclofenac (10 μM)	NDGA (10 μM)
AA (10 μM)	0.71±.011	0.35±0.09*	0.79±0.13
LA (10 μM)	0.55±0.14	0.56±0.15	0.65±0.14
LPC (50 μM)	0.63±0.11	0.59±0.13	0.68±0.15

Numerals are mean relative activity to the activiry immediately after making inside-out patch preparation, ±SEM of 5 to 6 expeiments. NDGA : nordihydroguaiaretic acid, AA : arachidonic acid, LA : linoleic acid, LPC : lysophospha-tidylcholine. * : $p<0.05$ by Student's t-test as compared to the control

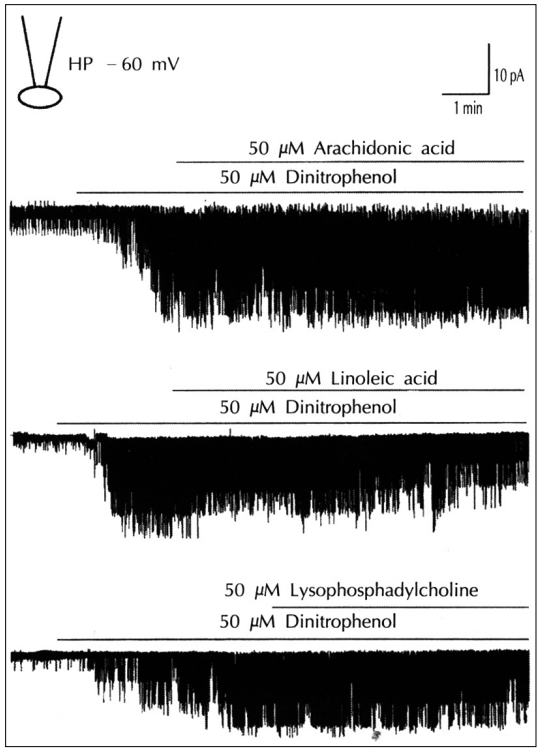

Fig. 9. Effect of free fatty acids on the dinitrophenol (DNP)-induced K_{ATP} channel activity in the cell-attached patch at -60 mV holding potential. Arachidonic acid or lysophosphatidylcholine added to the bath solution did not affect the dinitrophenol (DNP)-induced channel activity, but linoleic acid slightly reduced the DNP-induced channel activity.

즈음에는 거의 최대의 활성을 나타내었다. 이런 상태에서 bath액에 첨가한 AA와 LPC 50 μM은 excised inside-out patch에서 와는 달리 DNP 50 μM에 의해서 유도된 통로 활성에 거의 영향을 미치지 않았지만, LA는 DNP에 의해서 유도된 통로 활성을 억제하는 경향을 보였다(Fig. 9).

Excised inside-out patch의 세포내액에 ATP를 투여하여 통로 활성을 약화시킨 상태에서 유리 지방산이 통로 활성에 미치는 영향

Excised inside-out patch 시행 직후에는 세포내 ATP가 거의 없는 상태($[ATP]_i$=0) 이므로 K_{ATP} 통로 활성이 최대로 나타난다. 따라서 통로 활성을 증가시키는 약물의 효과는 은폐되어 나타나지 않을 것이다. 유리 지방산이 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 알아보고자 excised inside-out patch의 세포내액에 ATP 100 μM을 투여하여 통로 활성을 억제하고 여기에 유리 지방산(AA, LA 및 LPC 각 50 μM)을 첨가하여 통로 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 유리지방산은 ATP 존재하의 통로 활성이 약화된 상태에서도 통로 활성을 증가시키지 않았다(Fig. 10).

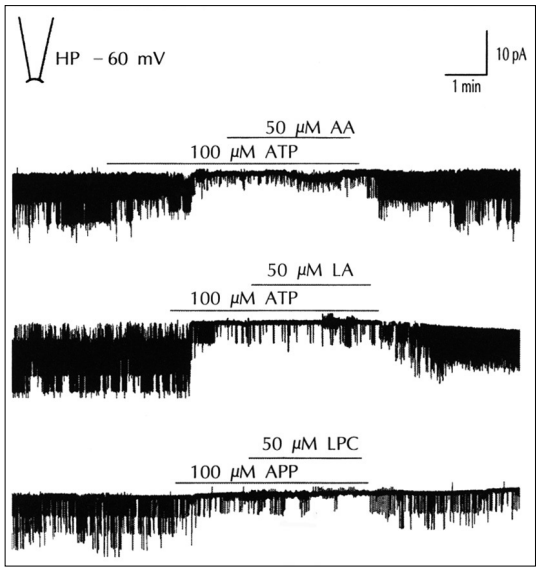

Fig. 10. Effects of the three free fatty acids (FFAs ; AA arachidonic acid, LA linoleic acid and LPC lysophosphatidyl-choline) on the attenuated K_{ATP} channel activity by internal ATP in the inside-out patch at -60 mV holding potential. FFAs did not increase the channel activity even in the presence of internal ATP.

Transmembrane 활동전위 측정 실험

정상 Tyrode 액 관류하의 활동전위 특성

정상 대조군에서의 활동전위 변수값은, 최대이완기 전위(maximum diastolic potentials ; MDP)는 -81±1.2 mV, phase 0 탈분극의 최대상승속도(dV/dt max)는 241±18.9 V/sec, 활동전위 폭(action potential amplitude ; APA)은 121±2.9 mV, 90% 재분극시까지의 활동전위기간(action potential duration ; APD_{90})은 196±5.2 msec 이었다(Table 2의 control).

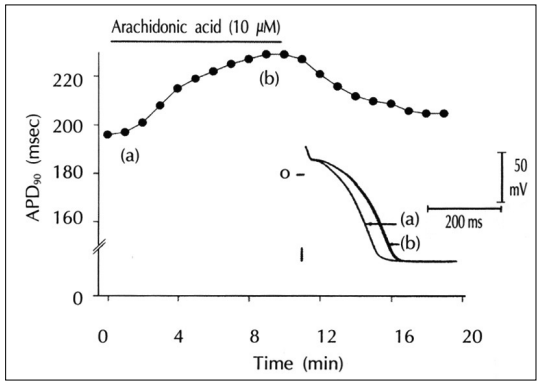

Fig. 11. Effect of arachidonic acid on the action potential duration (APD_{90}) in the ventricular fiber. 10 μM arachidonic acid lengthened APD_{90} up to 22% of the control

Table 2. Effects of various free fatty acids on action potential characteristics at 10 min superfusion in rat ventricular fibers

	MDP (mV)	dV/dt_{max} (V/sec)	APA (mV)	APD_{90} (ms)
Control	-81±1.2	241±18.9	121±2.9	196±5.2
AA (10 μM)	-79±2.1	225±14.2	119±2.0	239±5.2**
LA (10 μM)	-78±1.5	218±13.5	120±2.7	243±5.7**
LPC (50 μM)	-80±1.4	232±15.2	117±4.1	231±4.9*

MDP : maximal diastalic potential, dV/dt_{max} : maximum upstroke velocity of phase 0 depolarization, APA : action potential amplitude, APD_{90} : action potential duration at 90% repolarization. AA (arachidonic acid), LA (linoleic acid), LPC (lysophos-phatidylcholine). Numerals are mean±SEM of 5 to 6 experimental results. * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ by Student's t-test as compared to the control.

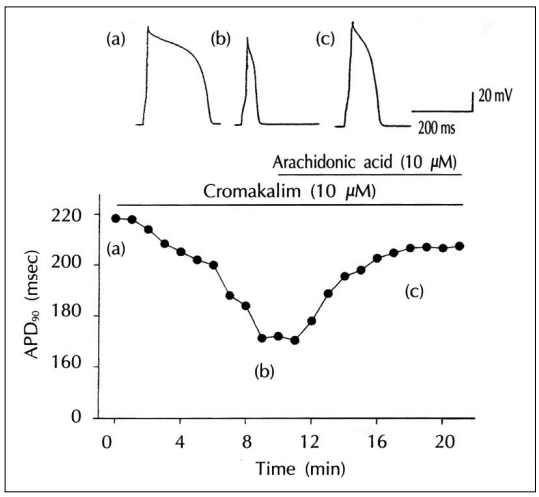

Fig. 12. Influence of arachidonic acid on the action potential duration duration (APD90) during cromakalim (10 μM) application in the ventricular fiber. Arachidonic acid (10 μM) attenuated the cromakalim-induced APD90-shortening effect.

유리 지방산 관류가 활동전위 특성에 미치는 영향

유리 지방산 관류시 90% 재분극시까지의 활동전위 기간(APD_{90})은 점차 증가하기 시작하여 7~10분 경과시에는 거의 최대의 증가를 일으켜, 10 μM의 arachidonic acid 및 linoleic acid 그리고 50 μM의 lysophosphatidylcholine 관류시 각각 대조군 치에 비하여 22, 24 및 18% 증가하였다. 그러나 APD 90을 제외한 다른 활동전위 변수는 의미있는 변화가 없었다(Fig. 11, Table 2).

유리 지방산이 Cromakalim의 활동전위 기간 감소 효과에 미치는 영향

K_{ATP} 통로 opener인 cromakalim(10 μM)을 관류시키면 APD_{90}은 감소하였고 이 감소 효과는 arachidonic acid(10 μM)를 혼합하여 관류시에는 유의하게 감약되었다(Fig. 12).

고 찰

ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)는 여러 종(species)의 동물 세포에서 세포내 ATP의 농도 또는 ATP/ADP 비의 변동에 의하여 그 활성이 조절되는 이온통로로 잘 알려져 있으며,[26-28] 주로 혈관평활근의 막전위 및 긴장도를 조절하거나[29-31] 췌장의 β 세포에서의 인슐린 유리[7]에 중요한 역할을 한다고 알려져있다. 특히 심근 허혈후 수분내에 일어나는 세포의 칼륨(K^+) 손실[32-34] 및 세포외의 K^+ 축적 현상[35)36]은 심근이 허혈이나 저산소 상태에 놓이게 될 때 세포내 ATP 수준이 감소되어 K_{ATP} 통로가 열리면서 일어나는 K^+ 유출(efflux)에 기인한다고 생각할 수 있다. 그러나 허혈이 지속되어 후기(late stage-허혈 시작후 20분 이후)에 이르면 세포막 인지질의 분해가 일어나고, 이어서 arachidonic acid 같은 유리 지방산이나 lysophospholipid 같은 것들이 세포 내로 대량 유리되어 이것들이 세포내 효소 활성 억제, 세포막 기능 장애를 일으키는 등 허혈 심근에 유해한 작용을 하는 것으로 보고된 바 있다.[38-40] 이러한 유해 작용에는 일부 arachidonic acid와 같은 유리 지방산 또는 유리 지방산의 세포내 대사산물이 K_{ATP} 통로 활성을 조절하여 관여하고 있다는 것이 Langendorff 방법에 의한 관상동맥 관류압 변동 또는 평활근 수축력의 변동을 측정하는 방법으로 추론되어 왔다. 이에 본 연구에서는 유리 지방산이 세포막의 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로) 활성에 미치는 영향을 patch clamp 방법을 이용하여 보다 직접적으로 검토하고 허혈 심근에서 이들 물질이 어떠한 역할을 할 수 있을 것인지를 규명하고자 한 것이다.

본 연구에서 실험대상으로 했던 통로의 활성은 excised inside-out patch 시행직후, 즉 세포내 ATP가 거의 소실될 때 최대로 나타났고 세포내에 1 mM ATP를 첨가하면 활성이 약화되었다가 ATP를 제거하면 다시 활성이 나타나며 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 활성이 억제되는 점으로 보아 K_{ATP} 통로 활성임을 알 수 있었다. 다만 전류-전압 상관 관계 곡선으로부터 얻은 통로 활성의 slope conductance가 약 62 pS로서 다른 연구자들에 의한 동물의 심실근 단일 통로 conductance[3)4)41] 보다는 다소 낮았지만 이는 실험 조건이나 실험 동물 표본의 차이 때문인 것으로 추측된다.

Excised inside-out patch 시행직후 나타나는 K_{ATP} 통로 활성이 arachidonic acid를 비롯한 몇 가지 종류의 지방산에 의해서 용량 의존적으로 억제된 점은 Langendorff 심장에서 arachidonic acid가 관상동맥 관류압을 증가시키고 이 효과가 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide에 의해서 억제된다는 보고[19] 또는 관상동맥 평활근 세포를 이용한 whole-cell 실험에서

ATP-free pipette액으로 세포내부를 투석(dialyzing)하여 나타난 K_{ATP} 통로 활성이 arachidonic acid에 의해서 억제된다는 보고[42]와 일치한다. 유리 지방산의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효력이 약물에 따라 다른 것은 약물의 통로에 대한 민감도가 다름을 의미한다. 한편 Cell-attached patch 상태에서는 세포내 ATP 수준이 거의 정상일 것이므로 K_{ATP} 통로 활성은 나타나지 않는다. 따라서 K_{ATP} 통로 활성을 유도하기 위하여 bath액에 대사억제제 dinitrophenol[3)8)]을 투여하고 K_{ATP} 통로 활성이 나타난 상태에서 유리지방산을 투여하였더니 linoleic acid를 제외하고는 K_{ATP} 통로 활성에 거의 영향을 미치지 못하였다. 이러한 실험 결과는 arachidonic acid 또는 lysophosphatidylcholine의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과가 세포막의 외부보다는 내부의 어떤 부분에 작용하여 나타난 결과라는 것을 시사한다. 그러나 본 연구에서 linoleic acid가 다른 유리 지방산과는 달리 dinitrophenol-induced K_{ATP} 통로 활성을 억제시킨 점은 linoleic acid가 세포막의 수용체에 작용하였거나 세포내로 들어가서 효과를 냈을 것으로 추측되며 후자의 경우라면 유리 지방산의 세포막 투과성이 약물의 종류에 따라 다름을 의미한다. 본 연구 결과만으로는 유리 지방산이 세포막 표면에 작용하지 않았다고 보기는 힘들지만, 심실근을 단일 심실근세포로 분리하는 과정에 사용한 collagenase 효소가 세포막 표면의 수용체를 제거했을 가능성을 배제 할 수 없다.

소량의 arachidonic acid(10 μM)에 의한 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과가 cyclooxygenase 억제제인 diclofenac 처리하에서는 강화되지만 lipoxygenase 억제제인 nordihydroguaiaretic acid 처리에 의해서는 영향을 거의 받지 않은 점은, 본 연구의 결과만으로는 확실한 논거를 말하기는 곤란하지만, 세포내로 유리된 arachidonic acid중 일부가 lipoxygenase pathway를 거쳐 leukotriene과 같은 대사산물이 생성되고 이 대사산물이 K_{ATP} 통로 활성을 더욱 더 억제시킨다고 생각할 수 있다.

Arachidonic acid를 포함한 유리 지방산의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과가 통로단백에 직접 작용하여 나타난 것인지 아니면 이차전령(second messenger)과 같은 다른 신호전달 체계를 통하여 나타난 것인지는 본 연구의 결과만으로는 알 수가 없다. 또한 다양한 종류의 eicosanoid의 전구물질인 arachidonic acid 같은 유리지방산의 K_{ATP} 통로 활성 억제 작용이 유리 지방산 고유의 작용인지 또는 대사산물을 통한 작용인지를 판단하기에는 미흡하며 앞으로 더 추구해봐야 할 문제이다. Ordway 등[43]은 유리 지방산이 K^+로에 직접 작용할 가능성을 시사하는 연구 결과를 발표한 바 있고, Kim과 Clapham[17]은 arachidonic acid의 대사산물인 prostaglandin이 통로 주변 지질의 조성을 변화시킴으로서 K^+ 통로 활성을 변화시킨다는 보고한 바 있다. 이 밖에도 많은 연구자들이 대사산물인 prostaglandin에 의해서 cAMP, IP_3 리고 DAG 같은 이차전령 물질의 세포내 농도가 바뀜에 따라 간접적으로 통로 활성이 조절된다고 보고한 바 있다.[44-49]

Excised inside-out patch 시행직후의 세포내액(internal solution)에 ATP는 거의 없다. 따라서 patch 세포막의 K_{ATP} 통로는 최대의 활성을 보일 것이며 이 때에는 통로 활성을 증가시킬 수 있는 약물을 투여해도 더 이상의 통로 활성 증가는 일어나지 않을 것이다. 따라서 본 연구에서는 유리 지방산이 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 알아보기 위하여 excised inside-out patch 시행후 통로 활성이 최대로 나타났을 때 세포내액에 100 μM의 ATP를 투여하여 통로 활성을 약화시키고 여기에 유리 지방산을 투여하여 보았으나 약화된 통로 활성은 영향을 거의 받지 않았다. 다시 말하면 유리 지방산은 K_{ATP} 통로 활성을 증가시키지 않았다. 그러나 Xiaoping과 Lee[43]는 개의 관상동맥 평활근 세포의 whole-cell 실험에서 세포내부를 1 mM ATP pipette액으로 투석하고 arachidonic acid를 bath액에 투여하면 K_{ATP} 통로 활성이 증가된다는 연구 결과를 보고 하였는바 이는 유리 지방산이 K_{ATP} 통로 활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 제시한 것으로 심실근 세포의 inside-out 실험인 본 연구의 결과와는 상반 되어 더 추구해봐야 할 것 같다. 한편 유리 지방산이 transmembrane 활동전위 특성 중 탈분극후 90% 재분극시까지의 기간(APD_{90})을 연장시킨 것은 유리 지방산이 칼륨통로를 억제한다는 점을 시사하고 있다. Cell-attached patch에서 arachidonic acid와 lysophosphatidylcholine이 K_{ATP} 통로 활성에 영향을 미치지 않은 점으로 미루어 유리 지방산이 K_{ATP} 통로를 억제시켜 활동전위 기간을 증가시켰다고 확언할 수는 없다. 그러나 linoleic acid가 cell-attached patch에서 K_{ATP} 통로 활성을 억제시키는 경향을 보였고, K_{ATP} 통로

opener인 cromakalim에 의한 활동전위 기간 감소 효과가 arachidonic acid에 의해서 감약된 점은, 유리 지방산에 의한 활동전위 기간 증가 효과가 일부 K_{ATP} 통로를 억제하여 일어남을 시사하고 있다.

결론적으로 유리 지방산은 흰쥐 심실근 세포막의 K_{ATP} 통로 활성을 억제하고 활동전위 기간을 증가시킴으로써 심근허혈시의 세포 보호와는 반대로 작용하므로 허혈시 심근의 보호를 위해서는 유리 지방산의 작용을 억제하는 쪽으로 중재해야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

Arachidonic acid로 대표되는 유리 지방산은 심근의 허혈이나 대사 억제시와 같은 비정상적인 상태에서 세포막이 붕괴되면서 세포내로 대량 유리되어 여러 가지 부작용을 일으키는 것으로 알려져있다. 근래에 유리 지방산 또는 그 대사산물이 허혈 현상과 관련이 있는 ATP-민감성 칼륨 통로 활성의 조절에 관여한다는 사실이 Langendorff 방법에 의한 관상동맥 관류압 변동 또는 평활근 수축력의 변동을 측정하는 방법으로 추론되고있다. 이에 본 연구에서는 유리 지방산이 흰쥐 심실근 세포막의 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로) 활성에 미치는 영향을 patch clamp 및 transmembrane 활동전위 측정 방법을 이용하여 직접적으로 검토하고 허혈심근에서 이들 물질이 어떠한 역할을 할 수 있을 것인지를 규명하고자 하였다.

방 법 :

K_{ATP} 통로 활성은 효소(collagenase) 분리법으로 분리한 흰쥐의 단일 심실근세포에서 excised inside-out 및 cell-attached patch clamp 방법으로 측정하였고, transmembrane 활동전위는 흰쥐의 심실근 표본에서 관습적인 3M-KCl 미세전극기법으로 기록하였다.

결 과 :

Arachidonic acid(AA), linoleic acid(LA) 및 lysophosphatidylcholine(LPC)은 excised inside-out patch의 K_{ATP} 통로 활성을 용량 의존적으로 억제하였으며 통로 활성을 50% 억제하는 용량(IC_{50})은 AA는 88±11.2, LA는 49±12.5 그리고 LPC는 188±17.4 μM 이었다. 통로열림의 빈도와 평균 통로열림 기간은 각각의 유리 지방산에 의하여 현저히 감소하였으나 단일 통로 전류의 크기는 변하지 않았다. AA(50 μM)와 LPC(50 μM)는 cell-attached patch의 bath액에 첨가한 대사억제제 dinitrophenol(50 μM)에 의해서 유도되는 통로 활성에 영향을 미치지 않았지만 LA(50 μM)는 통로 활성을 억제하는 경향을 보였다. 10 μM AA의 excised inside-out patch의 K_{ATP} 통로 활성 억제 효과는 cyclooxygenae 억제제인 diclofenac(10 μM)에 의해서는 유의하게 증가하였으나 lipoxygenase 억제제인 nordihydroguaiaretic acid(10 μM)에 의해서는 영향을 받지 않았다. AA(50 μM), LA(50 μM) 및 LPC(50 μM)는 excised inside-out patch의 세포내액에 100 μM ATP를 투여하여 K_{ATP} 통로 활성이 약화된 상태에서도 통로 활성을 증가시키지 않았다. 유리 지방산 관류후 10분 경과시의 활동전위 변수중 APD 90은 대조군에 비해서, 10 μM의 AA 및 LA 그리고 50 μM의 LPC 관류시 각각 22%, 24% 및 18% 증가하였다. 10 μM의 AA는 cromakalim(10 μM)에 의한 APD 90 감소 효과를 감약시켰다.

결 론 :

이상의 연구 결과로부터 유리 지방산은 직접 또는 일부 대사산물을 통하여 K_{ATP} 통로 활성을 억제하고 활동전위 기간을 증가시키며, 이와 같은 유리 지방산의 효과는 허혈 심근에 걸리는 부하를 증가시키고 심근 손상을 가중시킬 것으로 추론하였다.

중심 단어 : 유리 지방산 · 활동전위 · ATP-민감성 칼륨통로 · 흰쥐 · 심실근.

이 연구는 대한순환기학회 한국화이자 산학협동연구비(산학제98-3호)와 1998년도 전남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

1) Noma A. *ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 1983;305:147-8.*
2) Kakei M, Noma A. *Adenosine-5'-triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. J Physiol (Lond) 1984;352:265-84.*
3) Trube G, Hescheler J. *Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. Pflgers Arch 1984;401:178-84.*
4) Kakei M, Noma A, Shibasaki T. *Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guineapig ventricular cells. J Physiol (Lond) 1985;363:441-62.*
5) Findlay I. *ATP-sensitive K^+ channels in rat ventricular*

myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations. Pflugers. Arch 1987;410:313-20.
6) Weiss J, Lamp ST. *Cardiac ATP-sensitive K^+ channels: Evidence for preferential regulation by glycolysis. J Gen Physiol 1989;94:911-35.*
7) Ashcroft FM. *Adenosine-5'-triphosphate-sensitive potassium channels. Annu Rev Neurosci 1988;11:97-118.*
8) Escande D. *The pharmacology of ATP-sensitive K^+ channels in the heart. Pflgers Arch 1989;414(suppl. 1): S93-S98.*
9) Noma A, Takano M. *The ATP-sensitive K^+ channel. JPN J Physiol 1991;41:177-87.*
10) Nichols CG, Lederer WJ. *Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. Am J Physiol 1991;261:H1675-H1683.*
11) Lynch JH, Sanguinetti MC, Kimura S, Bassett AL. *Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. FASEB J 1992;6:2952-60.*
12) McPherson GA. *Current trends in the study of potassium channel openers. Gen Pharmacol 1993;24:275-81.*
13) Antzelevitch C, Di Diego JM. *Role of K^+ channel activators in cardiac electrophysiology and arrhythmias. Circulation 1992;85:1627-9.*
14) Chien KR, Han A, Sen A, Buja LM, Willerson JT. *Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Circ Res 1984;54:313-22.*
15) Burton KP, Buja LM, Sen A, Willerson JT, Chien KR. *Accumulation of arachidonates in triacylglycerols and unesterified fatty acids during ischemia and reflow in the isolated rat heart. Am J Pathol 1986;124:238-45.*
16) McHowat J, Liu S, Michael HC. *Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca^{2+}-independent PLA_2 in hypoxic ventricular myocytes. Am J Physiol 1998;274 (Cell Physiol 43):C1727-C1737.*
17) Kim D, Clapham DE. *Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. Science 1989;244:1174-6.*
18) Wallert MA, Ackerman MJ, Kim D, Clapham DE. *Two novel cardic atrial K^+ channels, I K.AA and I K.PC. J Gen Physiol 1991;98:921-39.*
19) Bouchard J, 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.*
20) Zhang H, Stockbridge N, Wen B, Krueger C, Cook D. *Glibenclamide relaxes vascular smooth muscle contraction produced by prostaglandin $F_{2\alpha}$. Eur J Pharmacol 1991;195:27-35.*
21) Zhang H, Cook D. *Antagonism of eicosanoid-induced contraction of rat aorta by sulphonylureas. Pharmacology 1994;49:173-83.*
22) Nielsen-Kudsk JE, Thirstrup S. *Antidiabetic sulfonylureas relax isolated rabbit coronary arterties. Euro J Pharmacol 1991;209:273-5.*
23) Jackson WF, Konig A, Dambacher T, Busse R. *Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. Am J Physiol 1993; 264:H238-H243.*
24) 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. Pflgers Arch 1981;391:85-100.*
25) Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. *Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature 1985;316:736-8.*
26) Cook DL, Hales CN. *Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β-cells. Nature 1984;311:271-3.*
27) Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. *Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. Science 1989;245:177-80.*
28) Escande D, Standen N. *K^+ channels in cardiovascular medicine. Springer-Verlag, Paris;1993.*
29) Clapp LH, Gurney AM. *ATP-sensitive K^+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol 1992;262(Heart Circ. Physiol. 31): H916-H920.*
30) Daut J, Standen NB, Nelson MT. *The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. J Cardiovasc Electrophysiol 1994;5:154-81.*
31) Xu X, Lee KS. *Characterization of the ATP-inhibited K^+ current in canine coronary smooth muscle cells. Pflgers Arch 1994;427:110-20.*
32) Vleugels A, Vereecke J, Carmeliet E. *Ionic currents during hypoxiain voltage-clamped cat ventricular muscle. Circ Res 1980;47:501-8.*
33) Kleber AG. *Extracellular potassium accumulation in acute myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol 1984;16:389-94.*
34) Weiss J, Shine KI. *Effects of heart rate on extracellular $[K^+]$ accumulation during myocardial ischemia. Am J Physiol 1986;250:H982-H991.*
35) Hill JL, Gettes LS. *Effect of acute coronary artery acclusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine. Circulation 1980;61:768-78.*
36) Hirche H, Franz C, Bos L, Bissig R, Lang R, Schramm M. *Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrena-line release as possible cause of early arrythmias following acute coronary artery occlusion In pigs. J Mol Cell Cardiol 1980;12:579-93.*
37) Corr PB, Gross RW, Sobel BE. *Amphiphatic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. Circ Res 1984;55:135-54.*
38) Kiyosue T, Arita M. *Effects of lysophosphatidylcholine on resting potassium conductance of isolated guinea pig ventricular cells. Pflugers Arch 1986;406:296-302.*
39) Sen A, Miller JC, Reynolds R, Willerson JT, Buja LM, Chien KR. *Inhibition of the release of arachidonic acid prevents the development of sarcolemmal membrane defects in ccultured rat myocardial cells during adenosine triphosphate depletion. J Clin Invest 1988;82:1333-8.*
40) van Bisen M, van der Vusse GJ, Willemsen PHM, Coumans WA, Roemen THM, Reneman RS. *Lipid alterations in isolated, working rat hearts during ischemia and reperfusion: Its relation to myocardial damage. Circ Res 1989;64:304-14.*
41) Bechem M, Glitsch HG, Pott L. *Properties of an inward rectifying K channel in the membrane of guineapig atrial cardio-balls. Pflgers Arch 1983;399:186-93.*
42) Xiaoping X, Lee KS. *Dual effects of arachidonic acid on ATP-sensitive K^+ current of coronary smooth muscle cells. Am J Physiol 1996;270(Heart Circ Physiol 39):H1957-*

H1962.

43) Ordway RW, Walsh JV, Singer JJ. *Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooh muscle cells. Science 1989;244:1176-9.*

44) Kurachi Y, Ito H, Sugimoto T, Shimizu T, Miki I, Ui M. *Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K^+ channel. Nature 1989; 337:555-7.*

45) Scherer RW, Breitwieser GE. *Arachidonic acid metabolites alter G protein-mediated signal transduction in heart. Effects on muscarinic K^+ channels. J Gen Physiol 1990; 96:735-55.*

46) Ling BN, Kokko KE, Eaton DC. *Prostaglandin E_2 inhibits apical Na^+ channels in rabbit cortical collecting tubules via protein kinase C (Abstract). J Am Soc Nephrol 1991;2:744.*

47) Miyoshi H, Nakaya Y. *Activation of ATP-sensitive K^+ channels by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. Biochem Biophys Res Commun 1993;193:240-7.*

48) Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y, Zeng X-R, Inoue I. *Mechanism of activation of the Ca^{2+}-activated K^+ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. Life Sci 1993;53:1129-35.*

49) Nakhostine N, Lamontagne D. *Contribution of prostaglandins in hypoxia-induced vasodilation in isolated rabbit hearts. Relation to adenosine and K_{ATP} channels. Pflgers Arch 1994;428:526-32.*