

지연 후탈분극의 발생에 미치는 α -아드레날린성 수용체의 역할*

전남대학교 의과대학 약리학교실, 내과학교실** 및 수의과대학 약리학교실***

김재하 · 주경채 · 주정민 · 국 현 · 신동호*** · 조정관**

=Abstract=

Role of α -Adrenergic Receptors in the Development of Delayed Afterdepolarization

Jae-Ha Kim, M.D., Kyung-Chae Joo, M.D., Jeong-Min Ju, D.V.M.,
Hyun Kook, M.D., Dong-Ho Shin, D.V.M.,*** Jeong-Gwan Cho, M.D.**

*Departments of Pharmacology and Internal Medicine,** Chonnam University Medical School,
Department of Pharmacology, Chonnam University College of Veterinary Medicine,***
Kwangju, Korea*

Background : To investigate the role of α -adrenergic receptors in the development of delayed afterdepolarization, the effect of α -adrenoceptor stimulation and blockade on ouabain-induced delayed afterdepolarization(DAD) was examined in rabbit heart Purkinje fibers.

Methods : Purkinje fibers, taken from adult rabbit(1.8 – 2.0kg) heart anesthetized with pentobarbital, were mounted in a Lucite chamber and superfused with Tyrode's solution. The transmembrane potentials were measured by the conventional microelectrode technique while the fibers were being stimulated with rectangular pulses of 50% above threshold voltage. The delayed afterdepolarizations were induced by overdrive excitation in the presence of ouabain.

Results : Delayed afterdepolarizations were not observed during superfusion of the control Tyrode's solution containing propranolol(5×10^{-7} M). However, the addition of ouabain in the presence of propranolol elicited DADs which were dose-, time- and drive cycle length-dependent.

Phenylephrine(PE : 10^{-7} M), an α -adrenoceptor agonist, potentiated the ouabain-induced DAD during the initial superfusion(for 10 or 20 min) of the test Tyrode's solution. However, it was followed by attenuating-effects after a superfusion time of 50 to 60 min. Both effects showed ouabain dose-dependence.

Ouabain(2×10^{-7} M), in the presence of propranolol, depolarized the maximum diastolic potential and shortened the action potential duration, and the addition of PE(10^{-7} M) did not affect the characteristics of action potential except a decrease in velocity of phase 0 depolarization.

Prazosin, an α_1 -adrenoceptor antagonist, inhibited the PE's enhancing effects of ouabain-induced DAD at 20 min superfusion, but did not affect the attenuating-effects of PE at 60 min superfusion. On the other hand, yohimbine, an α_2 -adrenoceptor antagonist, did not affect the PE's DAD potentiating-effects at 20 min superfusion, but inhibited the attenuating-effects of

*본 논문의 내용은 일부 1994년도 전남대학교병원 임상연구소 연구비에 의하여 이루어진 것임.

PE at 60 min superfusion.

Conclusion : It is inferred that α -adrenergic stimulation induce delayed afterdepolarization and triggered activity in the rabbits, being responsible for the arrhythmia development, and the effects are mainly due to the action of α_1 -subtype adrenoceptor stimulation.

KEY WORDS : Delayed afterdepolarization · α -adrenoceptor · Ouabain.

서 론

부정맥은 임상적으로 흔하며 급사의 원인이 되는 질환 중의 하나이다. 특히 심근경색 또는 허혈상태에 있거나 회복된 후에 일어나는 심실성 부정맥은 생명을 위협하는 경우가 많다. 부정맥을 실험실에서 연구하는 것은 쉽지가 않다. 우선 부정맥의 동물 모델을 만들기가 어렵고 부정맥을 일으키게 하는 기전에는 여러가지 인자가 복합적으로 작용하기 때문이다. In vitro 부정맥 연구모델로서 비교적 잘 알려진 것에는 triggered activity를 일으키게 하는 지연 후탈분극(delayed afterdepolarization)이 있다.

지연 후탈분극은 Ca^{2+} 과부하상태에 있는 심장세포에서 활동전위의 재분극후에 나타나는 막전위의 진동으로서 정상적인 pacemaker 전위인 자발적 이완기 탈분극(spontaneous diastolic depolarization)과는 구별된다^{1,2)}. 지연 후탈분극의 크기가 활동전위의 upstroke를 일으키는 내향성 전류를 활성화시킬 수 있는 정도에까지 도달하면 triggered impulse가 시작되거나, 때로는 역치(threshold) 전위에 도달하지 않더라도 활동전위를 trigger하여 부정맥의 한 요인이 될 수가 있다고 알려져 있다³⁾.

한편 심장기능의 대부분을 지배하고 있는 교감신경계의 신경체액성(neurohumoral) 조절과 심장박동, 특히 부정맥과의 관계는 그동안 광범위하게 연구되어 왔다. 지금까지 관심의 대상이 되어왔던 심장에서의 교감신경성 조절의 대부분은 주로 β -아드레날린계를 통한 것이었다. 즉 심장기능의 근간이 되는 동방결절(sinus node)에서의 자극의 시작, 전도 그리고 심근의 수축에 대한 β -아드레날린성 자극효과가 주요 연구대상이었다. 여기에 비해서 α -아드레날린계를 통한 교감신경성 조절에 관한 연구는 그다지 많지 않다. 사실 근래에까지도 심근이나 심장의 전도계에 α -아드레날린성 수용체의 존재여부 자체가 의문시 되었었다. 그럼에도 α -아드레날린계는 자

극의 시작이나 재분극에 영향을 줄 뿐만아니라 어떤 종류의 부정맥의 발생과도 관련이 있음이 입증되고 있다^{4, 5)}. 더 나아가 심근이나 전도계의 자극의 시작과 재분극의 조절에 있어서 α -아드레날린성 수용체의 아형(subtype)인 α_2 -수용체보다는 α_1 -수용체가 더 중요한 역할을 하고 있다는 사실도 알려지고 있다⁶⁾. 고양이의 Purkinje fiber에서 고농도의 Ca^{2+} 과 β -아드레날린성 차단제하에서 α -아드레날린성 수용체 자극시에 지연 후탈분극과 triggered activity가 발생하고 이것이 α -아드레날린성 차단제에 의해서 억제된다는 보고⁷⁾가 있고 양의 Purkinje fiber에서는 propranolol 존재하에서 epinephrine에 의해서 자동능이 유발되고 이러한 효과가 phentolamine에 의해서 차단된다는 것이 알려져 있다⁸⁾. 또한 α -아드레날린성 수용체를 자극하면 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하는데 이는 β -수용체 자극시 일어나는 직접적인 내향성 Ca^{2+} 전류의 증가에 의한 효과가 아니고 활동전위기간의 증가에 따른 간접적인 내향성 Ca^{2+} 전류증가에 의한 것이라고 알려져 있다⁹⁾. 이러한 점으로 미루어 세포내 Ca^{2+} 과부하가 있을때 나타나기 쉬운 지연 후탈분극의 발생과 α -아드레날린성 수용체가 관련이 있을 것이라고 추측할 수 있다. 다시말하면 α -아드레날린성 작동제는 부정맥을 유발하는 효과를 나타내고 α -아드레날린성 차단제는 부정맥을 억제하는 효과를 갖는다고 할 수 있다. 지연 후탈분극은 부정맥을 일으킬 수 있는 요인중의 하나이므로 α -아드레날린성 수용체와 지연 후탈분극과의 관계를 규명하는 것은 부정맥의 발생기전을 밝히는데 있어서 중요한 근거자료가 될 수 있음이 분명하다.

본 연구에서는 가토의 심장에서 적출해낸 Purkinje fiber에서, ouabain을 첨가한 Tyrode액 관류시 나타나는 지연 후탈분극에 미치는 몇가지 α -아드레날린성 작동제 및 길항제의 영향을 조사하여 α -아드레날린성 수용체와 지연 후탈분극의 발생관계를 보다 명확히 밝혀내어 부정맥의 발생기전과 α -아드레날린성 수용체의 역할을 규명하고자 하였다.

실험방법

Pentobarbital sodium(50mg/kg, 정맥내)으로 마취한 가토(2kg 내외)의 흉부를 절개하여 심장을 꺼낸후, 95% O₂와 5% CO₂를 혼합한 가스를 bubbling시켜 pH가 7.4로 유지된, 냉 Tyrode액(조성(mM) : NaCl 125, NaHCO₃ 24, KCl 4, NaH₂PO₄ 1.8, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 2.7, dextrose 5.5)에 넣어 놓고 광학현미경하에서(20~50×) 양심실로부터 Purkinje fiber를 분리해내어 silastic base의 Lucite chamber에 고정하고 유리 열교환기를 이용하여 36~37℃로 유지시킨 Tyrode액을 12ml/min의 속도로 관류시켰다. 활동전위를 유도하기 위한 표본의 자극은 자극기(Grass, S48)에 연결한 양극성 은으로 만든 양극 전극도자(bipolar silver electrode : 외경 0.2mm)를 통하여 2~3ms 기간의 구형파를 역치 전압의 1.5배로 가하여 시행하였다. 약 1시간이 경과후 표본이 안정되면 활동전위를 기록하기 위하여 3M KCl을 넣은 conventional 유리미세전극(직류저항이 10~30MΩ)을 미세위치조정기(micromanipulator : Brinkmann)를 통하여 세포내에 찔러넣고 이것을 증폭기(electrometer : WPI 7071A)를 통하여 오실로스코프(Tektronix 5113)에 기록하고 동시에 기록기(Gould 2400)에 기록하였다. Tissue bath는 3M KCl agar bridge와 Ag-AgCl junction을 이용하여 ground에 연결하였다. 활동전위로부터 측정된 변수값(parameter)은 phase 0 탈분극의 최대상승속도(dV/dt_{max} : V/sec), 최대이완기 전위(maximum diastolic potential : mV), 활동전위의 크기(action potential amplitude : mV), 50% 또는 90% 재분극시까지의 활동전위기간(APD₅₀, APD₉₀ : ms), 그리고 지연 후탈분극의 전위(amplitude : mV)등 이었다. dV/dt_{max}는 증폭기의 출력신호를 연산 증폭기(operational amplifier)를 이용하여 제작한 미분 증폭기에 연결하여 오실로스코프상에 기록하였다.

실험은, β-아드레날린성 수용체에 의한 효과를 배제하기 위하여 β-아드레날린성 차단제인 propranolol (2×10⁻⁷M)이 함유된 대조(control) Tyrode액을 관류시키면서 활동전위의 각 변수 및 지연 후탈분극의 전위를 측정하여 대조군치로 하였다.

지연 후탈분극은 대조 Tyrode액에 ouabain(2×10⁻⁷M)

을 첨가하여 관류시키면서 overdrive excitation 방법¹⁰⁾에 의하여 유도하였다. 이때 자극의 주기간격(drive cycle length : DCL)은 400ms 즉 2.5Hz를 기본으로 하였고, DCL의 크기가 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위하여 250(4Hz)부터 800ms(1.25 Hz)까지의 다양한 주기간격으로 하였으며 자극 도중 매 2분마다 5초씩 자극을 중단하여 지연 후탈분극의 전위와 뒤이은 율동(rhythm)을 관찰하였다. 대조 Tyrode액에 α-아드레날린성 길항제인 prazosin 또는 yohimbine을 첨가하여 관류시키면서 활동전위의 각 변수와 지연 후탈분극의 전위를 측정하여 이것을 길항제하의 대조군치로 하였다. α-아드레날린성 수용체의 자극효과를 측정하기 위해서는 대조 Tyrode액에 phenylephrine 10⁻⁷M을 단독으로 첨가하거나 prazosin 또는 yohimbine과 함께 첨가한 시험(test) Tyrode액을 관류시켜 대조군에서 측정한 지연 후탈분극의 전위 및 활동전위의 변수값들과 비교하였다.

각 실험은, 기본적으로 시험 Tyrode액을 관류시킨 후 1시간까지 실시하였으며, 1시간 이내일지라도 triggered activity가 빈번해지고 지연 후탈분극의 전위가 더 이상 조율(pace)을 유지하기 힘들 정도로 커지면 실험을 중단하였다. 각 실험군간의 실험치 차이의 유의성 검토에는 Student's t-test를 사용하였다.

결 과

1. Ouabain에 의해 유발된 지연 후탈분극

β-아드레날린성 수용체의 작용이 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 배제하고자 본 연구의 모든 Tyrode액에는 β-아드레날린성 수용체 길항제인 propranolol 5×10⁻⁷M을 첨가하였고, 본 연구에서 Tyrode액이라 함은 propranolol만을 함유한 경우에 해당한다. Tyrode액 관류하에서는 어떠한 triggered activity도 나타나지 않았다(Fig. 1, 3 및 4). 그러나 여기에 ouabain(2×10⁻⁷M)을 첨가한 Tyrode액을 관류시에는 400ms drive cycle length(DCL) 자극후 10분에 2.7±0.73, 20분에 4.4±1.10 그리고 60분에 5.1±1.35mV(각 5례)의 지연 후탈분극이 나타났다(Fig. 1, 2). 첨가한 ouabain의 농도가 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 보기 위하여 각 용량의 ouabain 첨가 Tyrode액을 관류하면서 20분경과시의 지연 후탈분극의 크기를 조사하였는 바,

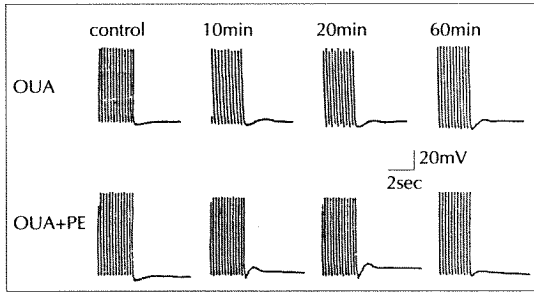


Fig. 1. Effects of ouabain(Oua; 2×10^{-7} M) alone and with phenylephrine(PE; 10^{-7} M) in the presence of propranolol(5×10^{-7} M) on the development of delayed afterdepolarization. The drive cycle length of stimuli was 400ms(2.5 Hz). The delayed afterdepolarization was not observed in the propranolol alone control Tyrode's solution.

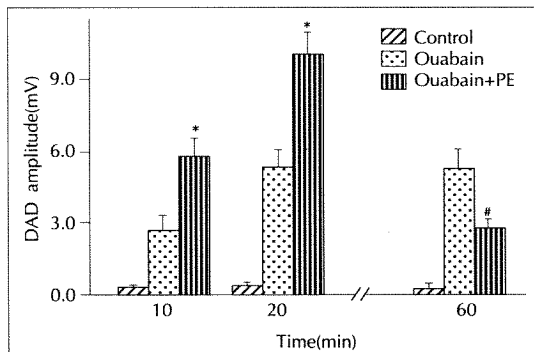


Fig. 2. Effects of phenylephrine(PE; 10^{-7} M) on the amplitude of ouabain(2×10^{-7} M)-induced delayed afterdepolarization in the presence of propranolol(5×10^{-7} M) at the time(min) after superfusion of the test Tyrode's solution. The drive cycle length of stimuli was 400ms(2.5 Hz). Each bar shows mean \pm S.E.M. obtained from 5 to 6 experiments. *, #p<0.05 vs ouabain-group.

ouabain 10^{-7} M 첨가시에 2.7 ± 0.45 , 2×10^{-7} M 첨가시에 5.1 ± 1.20 그리고 5×10^{-7} M 첨가시에 6.7 ± 0.90 mV로서(각 5례) 첨가한 ouabain의 용량에 비례하여 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5, 6). 또한 자극하는 DCL이 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 알아보기로 DCL을 250(4Hz)부터 800ms(1.25Hz)까지 증가시키면서 각 DCL 자극후 20분경에 나타나는 지연 후탈분극의 전위를 조사하였는 바 250ms시에 5.2 ± 0.91 , 400ms시에 5.0 ± 1.22 , 500ms시에 2.9 ± 0.96 그리고 800ms시에 1.85 ± 0.32 (각 5례)로서 DCL의 크기에 비례해서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

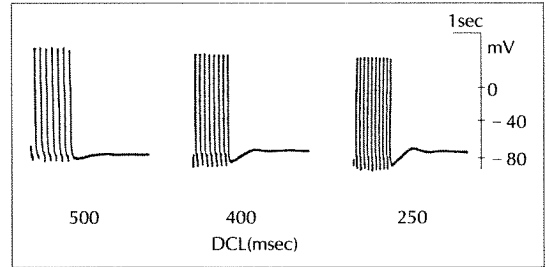


Fig. 3. Representative illustration of dependency of drive cycle length(DCL) of stimuli on the amplitude of ouabain(2×10^{-7} M)-induced delayed after depolarization in the presence of propranolol(5×10^{-7} M) at 20 min after superfusion of the test Tyrode's solution.

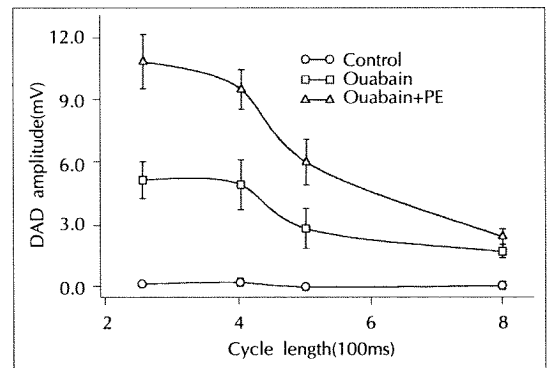


Fig. 4. Influence of drive cycle length of stimuli on the amplitude of delayed afterdepolarization in the presence of propranolol(5×10^{-7} M) at 20 min after superfusion of the test Tyrode's solution. Value and vertical bar shows mean and S.E.M. obtained from 5 to 6 experiments. The concentration of superfused ouabain was 2×10^{-7} M and that of phenylephrine(PE) 10^{-7} M, respectively.

2. Ouabain-유발성 지연 후탈분극에 미치는 phenylephrine(PE)의 영향

α -아드레날린성 수용체 작용제가 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 알아보기로 phenylephrine(PE) 10^{-7} M을 ouabain 2×10^{-7} M이 들어있는 Tyrode액에 첨가하고 400ms DCL자극후 나타나는 지연 후탈분극의 전위를 조사하였다. 10분치에서는 5.7 ± 0.87 mV로서 ouabain만에 의한 지연 후탈분극의 약 2.1배, 20분치에서는 9.6 ± 1.35 mV로서 약 2.2배 증가하였고 60분치에서는 2.6 ± 0.37 mV(각 5례)로서 오히려 1/2정도로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2). Ouabain과 PE(10^{-7} M)을 함께 첨가한 Tyrode액 관류시에 나타나는 지연 후탈분

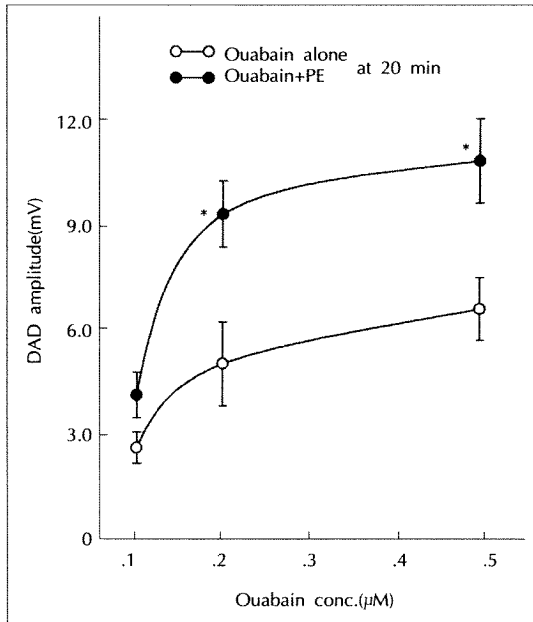


Fig. 5. Dose-response curves of ouabain alone and with phenylephrine (PE : 10^{-7} M) for amplitude of delayed afterdepolarization in the presence of propranolol (5×10^{-7} M) and 400ms drive cycle length (2.5 Hz) at 20 min after superfusion of test Tyrode's solution. Value and vertical bar shows mean and S.E.M. obtained from 5 to 6 experiments. *, $p < 0.05$ vs ouabain alone-group.

극은 250 ms시에 10.9 ± 1.3 , 400ms시에 9.6 ± 0.95 , 500ms시에 6.1 ± 1.3 , 800ms시에 2.5 ± 0.38 mV로서 ouabain (2×10^{-7} M)만을 첨가한 Tyrode액 관류시와 마찬가지로 DCL의 크기에 비례해서 감소하는 경향을 보였고, ouabain만을 첨가한 Tyrode액 관류시에 비하여 각각 2.1, 1.9, 2.1 그리고 1.2배 증가하였다 (Fig. 4). 또한 PE의 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가 또는 감소효과가 대조 Tyrode액에 첨가한 ouabain의 농도에 의해서 어떻게 영향을 받는지를 알아보기 위하여 400ms DCL 자극으로, 10^{-7} , 2×10^{-7} 그리고 5×10^{-7} M ouabain의 각 용량에 PE 10^{-7} M을 첨가한 시험 Tyrode액을 관류하면서 시간의 경과에 따른 지연 후탈분극의 발생을 조사하였다. Tyrode액 관류후 20분 경과시의 PE에 의한 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가 효과 및 60분경과시의 ouabain-induced 지연 후탈분극 감소효과는 ouabain의 용량에 의존적이었다 (Fig. 5, 6).

3. 활동전위 특성에 미치는 ouabain의 영향

본 연구에서 β -아드레날린성 수용체의 효과를 배제하

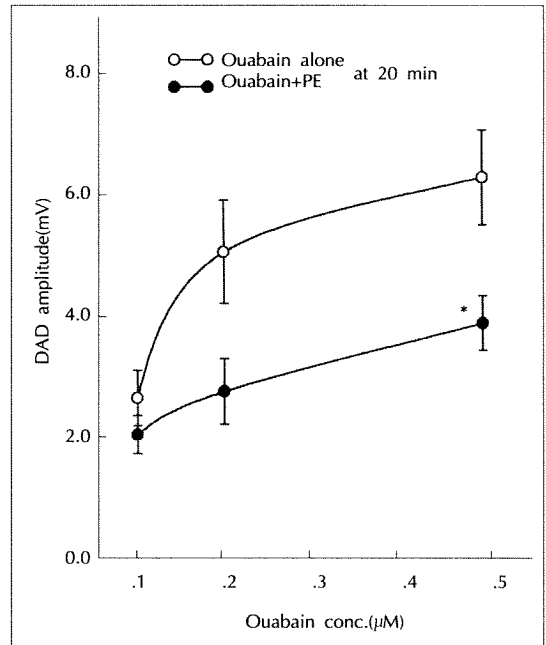


Fig. 6. Dose-response curves of ouabain alone and with phenylephrine (PE : 10^{-7} M) for amplitude of delayed afterdepolarization in the presence of propranolol (5×10^{-7} M) and 400ms drive cycle length (2.5 Hz) at 60 min after superfusion of test Tyrode's solution. Value and vertical bar shows mean and S.E.M. obtained from 5 to 6 experiments. *, $p < 0.05$ vs ouabain alone-group.

기 위하여 Tyrode액에 첨가한 propranolol 5×10^{-7} M은 400ms DCL 자극으로 관류 20분후 측정된 활동전위 변수중 활동전위기간을 단축시키는 경향을 보였으나 대조군치에 비하여 유의한 차이는 없었고 그 이외의 다른 변수값에는 영향을 미치지 않았다. Propranolol 존재하에서 ouabain 2×10^{-7} M은 관류 20분후 측정된 활동전위 변수값은, 최대이완기 전위 (MDP)의 증가, phase 0 탈분극의 최대상승속도 (dV/dt_{max})와 활동전위의 크기 (APA)의 감소, 그리고 50% 재분극시까지의 활동전위 기간 (APD_{50})의 단축등 이었다. (각 $P < 0.05$) (Table 1).

4. 활동전위 특성에 미치는 phenylephrine의 영향

Propranolol 5×10^{-7} M이 존재하는 Tyrode액에 첨가한 PE 10^{-7} M은 400 ms DCL 자극후 20분에 측정된 활동전위 변수값중 50% 및 90% 재분극시까지의 활동전위 기간 (APD_{50} 및 APD_{90})을 단축시켰으나 (각 $P < 0.05$) 그 이외의 변수값에는 영향을 미치지 않았다 (Table 1).

Table 1. Effects of ouabain and phenylephrine(PE) on action potential characteristics of Purkinje fiber in rabbits

	Control	Ouabain (2×10^{-7} M)	PE (10^{-7} M)	Ouabain+PE
MDP(mV)	-86 ± 0.8	$-82 \pm 0.9^*$	-84 ± 1.4	-83 ± 1.4
dV/dt_{\max} (V/sec)	425 ± 8.5	419 ± 10.5	431 ± 9.4	$396 \pm 7.9^{*#}$
APA(mV)	115 ± 2.1	$108 \pm 1.2^*$	113 ± 2.9	111 ± 2.3
APD ₅₀ (ms)	149 ± 4.7	$134 \pm 4.1^*$	$165 \pm 4.6^*$	151 ± 5.1
APD ₉₀ (ms)	31 ± 7.8	223 ± 8.9	$255 \pm 6.2^*$	242 ± 7.2

Numerals are mean \pm SE from 5 to 6 preparations at 20 min after superfusion with the drugs. MDP=maximum diastolic potential. dV/dt_{\max} =maximum upstroke velocity of phase 0 depolarization. APA=action potential amplitude. APD₉₀, APD₅₀=action potential duration at 90%, 50% repolarization respectively

* $p < 0.05$, by Student's t-test as compared to the control

$p < 0.05$, by Student's t-test as compared to the ouabain-group

Ouabain 2×10^{-7} M과 PE 10^{-7} M을 함께 첨가해서 관류했을시 phase 0 탈분극의 최대상승속도(dV/dt_{\max})는 propranolol만이 존재하는 Tyrode액 관류시에 비하여 감소하였고 Tyrode액에 ouabain만을 첨가해서 관류했을시에 비해서도 감소하였으나, 그 이외의 다른 변수값은 대조군치에 비하여 유의한 차이가 없었다(Table 1).

5. Phenylephrine의 ouabain-induced 지연 후 탈분극 증가 또는 감소효과에 미치는 prazosin 또는 yohimbine의 영향

α_1 -아드레날린성 수용체 길항제인 prazosin과 α_2 -아드레날린성 수용체 길항제인 yohimbine이 PE의 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가 및 감소효과에 어떻게 영향을 미치는지를 조사하였다. 이들 두 약물을 첨가한 Tyrode액을 15분 관류후, 다시 ouabain 2×10^{-7} M과 PE 10^{-7} M을 첨가시킨 Tyrode액을 관류하면서 400ms DCL 자극후 시간의 경과에 따라 나타나는 지연 후탈분극의 크기를 조사한 바 20분경과시 나타나는 PE의 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가효과는 prazosin 10^{-7} M 전처치시에는 약 23% 그리고 5×10^{-7} M 전처치시에는 약 60%($P < 0.01$) 감소하였으나 yohimbine 10^{-6} M 전처치시에는 영향을 받지 않았다. 그러나 60분 경과시에 나타나는 PE의 ouabain-induced 지연 후탈분극 감소효과는 prazosin 10^{-7} M 및 5×10^{-7} M 전처치시에는 영향을 받지 않았으나 yohimbine 10^{-6} M 전처치시에는 약 70%($P < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7).

6. 활동전위 특성에 미치는 prazosin 또는 yohimbine의 영향

α_1 및 α_2 -아드레날린성 길항제의 첨가가 활동전위 특성에 미치는 영향을 알아보고자 ouabain 2×10^{-7} M과

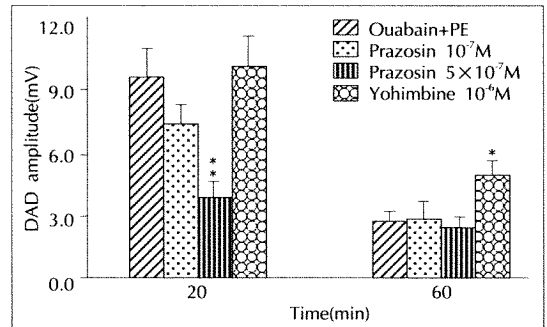


Fig. 7. Influences of prazosin or yohimbine on the phenylephrine's(PE : 10^{-7} M) increasing(at 20 min) and decreasing(at 60 min) effects of ouabain(2×10^{-7} M)-induce delayed afterdepolarization in the presence of propranolol(5×10^{-7} M) at the time(min) after superfusion of the test Tyrode's solution. The drive cycle length of stimuli was 400ms(2.5 Hz) respectively. Each bar shows mean and S.E.M. obtained from 5 to 6 experiments.

PE 10^{-7} M이 들어 있는 Tyrode액에 prazosin 10^{-7} M, 5×10^{-7} M 또는 yohimbine 10^{-6} M을 첨가하여 관류후 20분경과시에 활동전위의 변수값을 측정하였다. Prazosin 10^{-7} M 또는 yohimbine 10^{-6} M을 첨가한 Tyrode액 관류시에는 활동전위 변수값에 유의한 변동이 없었다. Prazosin 5×10^{-7} M을 첨가한 Tyrode액 관류시 최대 이완기전위(MDP)는 유의하게 감소되었으나($P < 0.05$) 그 이외의 변수값은 영향을 받지 않았다(Table 2).

고 안

In vitro에서 부정맥 발생기전 연구모델중 하나인 지연 후탈분극은 여러가지 실험조건에서 볼 수 있다. 즉 심근표본에 digitalis제제를 투여하거나^{11,12,13,14,15,16)} 표

Table 2. Effects of prazosin or yohimbine on action potential characteristics of Purkinje fiber under treated with ouabain (Oua) and phenylephrine(PE) in rabbits

	Oua+PE	Oua+PE+Prazosine (5×10^{-7} M)		Oua+PE+Yohimbine (10^{-6} M)
MDP(mV)	-83 ± 1.4	-85 ± 1.1	$-87 \pm 0.8^*$	-84 ± 1.2
dV/dt _{max} (V/sec)	396 ± 7.9	403 ± 8.8	392 ± 10.1	402 ± 8.4
APA(mV)	111 ± 2.3	110 ± 1.9	112 ± 2.9	110 ± 3.1
APD ₅₀ (ms)	151 ± 5.1	152 ± 5.4	149 ± 4.1	154 ± 3.7
APD ₉₀ (ms)	242 ± 7.2	238 ± 6.9	239 ± 6.4	245 ± 5.9

Legends are the same as in the Table 1

*p < 0.05, by Student's t-test as compared to the Oua+PE group

본을 관류하는 Tyrode액의 ionic 조성을 Na^+ -free, Ca^{2+} -rich¹⁷⁾ 또는 K^+ -free, Ca^{2+} -rich^{18,19)}로 바꾸어 관류시킨 경우등에 나타나는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서도 가토의 Purkinje fiber 표본에 digitalis제제인 ouabain을 첨가한 Tyrode액 관류시 지연 후탈분극이 발생하였으며 이 지연 후탈분극의 전위는 ouabain의 용량이 증가함에 따라 또한 ouabain의 관류시간이 증가함에 따라 증가하였고 전기자극의 주기간격이 짧아수록 증가하는 양상이었다(Fig. 1~6).

Ouabain의 세포에서의 주작용은 세포막의 Na^+ - K^+ pump를 억제하여 세포내 Na^+ 농도를 증가시키는 것이라고 알려져 있다^{20,21)}. 이렇게 해서 증가된 $[\text{Na}]_i$ 때문에 세포막에서의 Na^+ driving force가 감소하게 되고 결국 Na^+ - Ca^{2+} 교환계에 의한 Ca^{2+} 의 세포외로의 배출이 감소하기 때문에 결과적으로 $[\text{Ca}]_i$ 가 증가하게 되고 2차적으로 sarcoplasmic reticulum의 Ca^{2+} 유리를 자극하는(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) 복합적인 작용에 의하여 세포내 Ca^{2+} 과부하 상태가 유발된다고 알려져 있다^{22,23)}. Kass등²⁴⁾은 이렇게 해서 증가된 세포내 free Ca^{2+} 이 Na^+ 또는 K^+ 의 세포막 투과성을 증가시켜 일시적인 내향전류(I_{Li})가 흐르게 되고 이 내향전류가 지연 후탈분극을 유발하는 원인이 된다고 하였다. 즉 digitalis제제 관류시에 나타나는 지연 후탈분극은 결국 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가와 밀접한 관련이 있으며, 이는 인위적으로 Ca^{2+} 의 농도를 증가시킨 Tyrode액을 표본에 관류시켰을때 나타나는 지연 후탈분극 발생현상과 일맥상통한다고 할 수 있다. 세포내 free Ca^{2+} 의 증가가 Na^+ 또는 K^+ 의 세포막 투과성을 증가시키는 원인에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 Colquhoun등²⁵⁾은, 배양한 심근세포에서, patch-clamp 방법을 이용하여 세포내 Ca^{2+} 의 증가에 의해서 활성화되는 내향성 전류를

발견하고, 이것이 바로 지연 후탈분극 발생의 원인이 될 수 있으나 이 내향성전류는 막전위와는 무관하다고 하였다. 그러나 본 연구결과에서 ouabain(2×10^{-7} M)이 활동전위 변수중 최대이완기전위(MDP)를 증가시킨 점, 즉 막전위의 탈분극 현상(Table 1)은 ouabain에 의한 지연 후탈분극의 발생기전에 막전위의 변동이 일부 관여할 것임을 시사하고 있다. 자극하는 pulse의 drive cycle length(DCL)와 ouabain-induced 지연 후탈분극의 크기가 반비례하는 본 연구의 결과는(Fig. 3, 4) 아마도 DCL과 세포내 Ca^{2+} 농도간에 서로 반비례 관계가 있는 것과 일치하는 것 같다. 즉 자극의 빈도수가 증가하면 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가한다는 연구결과^{12,13,26,27)}가 이를 뒷받침한다. 한편 β -아드레날린성 차단제인 propranolol 존재하에서 α -아드레날린성 수용체 작용제인 phenylephrine(10^{-7} M)은 관류 10분 또는 20분 경과시에는 ouabain-induced 지연 후탈분극의 크기를 증가시켰고 관류 60분경과시에는 감소시켰으며(Fig. 2) 이러한 증가 및 감소는 ouabain의 용량에 의존적이었다(Fig. 5, 6). 심장에서 β -아드레날린성 수용체가 부정맥을 일으킨다는 사실은, 고양이의 Purkinje fiber 표본에서, norepinephrine이 세포내 Ca^{2+} 과부하상태에서 지연 후탈분극이나 triggered 활동전위를 유도하며 이러한 현상이 α -아드레날린성 수용체 차단제인 prazosin에 의해서는 거의 영향을 받지 않으나 β -아드레날린성 수용체 차단제인 propranolol에 의해서는 억제된다는 연구결과⁷⁾에 의해서 이미 증명되어 있다. 심장의 교감신경 지배는 α 와 β -아드레날린성 양수용체에 의해서 일어나고 있으나 β -아드레날린성 수용체의 역할이 α 에 비해서 월등하므로 그동안 α -아드레날린성 수용체의 역할은 거의 무시되어 왔다. 그러나 근래에 심장의 활동성 조절에 α -아드레날린성 수용체가 상당한 역할을 하고 있다

는 연구결과들이 나오고 있다^{6,28)}. 다시 말하면 α -아드레날린성 기전이 β -아드레날린성 기전의 우세한 역할에 가리워져 나타나지 않은 것으로 추측된다. 본 연구결과에서 propranolol 존재하에서 phenylephrine이 ouabain-induced 지연 후탈분극의 전위를 증가 또는 감소시켰고, 이러한 현상이 자극의 drive cycle length의 크기에 반비례하여 나타난 점(Fig. 4)등도 이러한 사실을 증명하고 있다.

α -아드레날린성 수용체 자극이 지연 후탈분극의 발생에 관여하는 기전으로는 우선 α -아드레날린성 수용체 작동제가 활동전위의 기간을 연장시킬 수 있다는 점이다^{29,30,31)}. 즉 탈분극의 기간이 길어지면 triggered activity가 나타날 수 있는 가능성이 그 만큼 많아진다고 할 수 있다. 본 연구에서도 phenylephrine(10^{-7} M)이 50% 및 90% 재분극시까지의 활동전위기간(APD 50 및 APD₉₀)을 유의하게 증가시켰고, 이러한 증가가 prazosin 전처리시에는 나타나지 않는 점으로 미루어 알 수 있다(Table 1 및 2). 또다른 기전으로는 α -아드레날린성 수용체 자극이 제2차 전령을 통해서 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 증가시키고^{7,32,33)} 결과적으로 세포의 Ca^{2+} 과부하상태를 가져오게 해서 지연 후탈분극이나 triggered activity를 유발케한다는 것이다. 실제로 허혈이나 재관류등 세포내 Ca^{2+} 과부하 상태를 초래하여 부정맥을 유발할 수 있는 경우에 prazosin이나 phentolamine 같은 α -아드레날린성 수용체 차단제들이 Ca^{2+} 과부하를 억제하고 부정맥의 발생빈도를 낮춘다는 보고^{34,35,36,37)}들이 있다. 본 연구에서, phenylephrine 장기 관류후(60분)에는 단기관류(10분 또는 20분)시와는 달리 ouabain-induced 지연 후탈분극이 오히려 감소하였고 이러한 감소현상이 yohimbine 전처리에 의해서 억제되어 나타난 점(Fig. 7)은 매우 흥미로운 사실이다. α -아드레날린성 수용체는 α_1 과 α_2 아형(subtype)으로 나뉘어지고 prazosin은 비교적 α_1 아형에, 그리고 yohimbine은 α_2 아형에 선택적인 것으로 미루어 단기관류시의 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가현상은 α_1 , 그리고 장기관류시의 감소현상은 α_2 -아드레날린성 수용체가 관여한다고 생각할 수도 있으나 무엇이 이처럼 수용체의 선택성이 바뀌게 하는지는 본 연구의 결과만으로는 알 수 없고 향후 더 추구해 볼만한 일인것 같다.

결과적으로 심장의 α -아드레날린성 수용체는 지연 후탈분극이나 triggered activity를 일으키고 따라서 허혈

또는 재관류시와 같은 세포내 Ca^{2+} 과부하시의 병적인 상태에서 부정맥의 유발에 중요한 역할을 하고 있음이 분명하다고 할 수 있다. 따라서 Ca^{2+} 과부하 상태에서 나타나는 부정맥의 치료에 α -아드레날린성 특히 prazosin과 같은 α_1 -아드레날린성 수용체 차단제의 사용을 고려해 볼 필요가 있을 것 같다.

요 약

연구배경 및 방법 :

In vitro에서 부정맥 발생기전의 연구모델이며 triggered activity를 일으키게 하는 지연 후탈분극의 발생과 α -아드레날린성 수용체와의 상관관계를 구명하고자, 가토의 심장으로부터 얻은 Purkinje fiber에서 3M KCl의 conventional 미세전극기법으로 활동전위를 측정하고, ouabain을 첨가한 Tyrode액 관류하에서 overdrive excitation 방법에 의해서 지연 후탈분극을 유도하고 몇가지의 아드레날린성 작동제 및 길항제가 지연 후탈분극의 발생에 미치는 영향을 조사하였다.

결 과 :

β -아드레날린성 수용체의 자극효과를 배제하기 위하여 propranolol(5×10^{-7} M)을 첨가한 대조 Tyrode액 관류시에는 지연 후탈분극은 나타나지 않았다. 그러나 여기에 ouabain을 첨가해서 관류했을시에는, 첨가한 ouabain의 용량 및 관류시간에 비례해서 그리고 전기자극의 drive cycle length(DCL; 250~800ms)에 반비례해서 지연 후탈분극의 전위폭이 증가하였다. α -아드레날린성 작동제인 phenylephrine(PE; 10^{-7} M)은 관류초기(10분 또는 20분경과)에는 ouabain(2×10^{-7} M)-induced 지연 후탈분극을 증가시켰으나 관류 60분경에는 오히려 감소시켰으며 이러한 증가 및 감소효과는 ouabain의 용량($10^{-7} \sim 5 \times 10^{-7}$ M)에 의존적이었다.

Ouabain(2×10^{-7} M)은 최대이완기전위(MDP)를 탈분극시켰으며 활동전위의 크기(APA), 50% 재분극까지의 활동전위기간(APD₅₀)을 감소시켰다. Ouabain 및 PE(10^{-7} M)를 첨가한 관류액은 phase 0 탈분극의 최대 상승속도를 감소시켰으나 그밖의 활동전위특성에는 영향을 미치지 않았다. α_1 -아드레날린성 길항제인 prazosin(5×10^{-7} M)은 PE(10^{-7} M)에 의한 ouabain-induced 지연 후탈분극의 증가효과는 억제하였으나 감소효과에는 영향을 미치지 않았다. 이와는 반대로 α_2 -아드레날

린성 길항제인 yohimbine(10^{-6} M)은 PE의 ouabain-induced 지연 후탈분극 증가효과에는 영향을 미치지 못하였으나 감소효과는 억제하였다.

결 론 :

이상의 실험성적으로부터 가토 Purkinje fiber의 α -아드레날린성 수용체의 자극은 ouabain-induced 지연 후탈분극의 전위를 증가시켜 triggered activity가 일어나게 하며 이는 주로 α_1 -아드레날린성 수용체를 통해서 일어나는 것으로 추론하였다.

References

- 1) Di Francesco D : A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibers. *J Physiol (Lond)* 314 : 359-376, 1981
- 2) Di Francesco D and Noble D : A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos trans R Soc Lond. Series B*, 307 : 353-398, 1985
- 3) Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM and Morgan HE : *The heart and cardiovascular system*, second edition, Raven Press, Ltd, New York, 1992
- 4) Del Balzo U, Rosen MR, Malfatto G, Kaplan LM and Steinberg SF : Specific α_1 -adrenergic receptor subtype modulate catecholamine induced increases and decreases in ventricular automaticity. *Circ Res* 67 : 1535-1551, 1990
- 5) Zaza A, Kline R and Rosen M : Effects of α -adrenergic stimulation on intracellular sodium activity and automaticity in canine Purkinje fibers. *Circ Res* 66 : 416-426, 1990
- 6) Benfey BG : Function of myocardial α -adrenoceptors. *Life Sci* 46 : 743-757, 1990
- 7) Kimura S, Cameron JS, Kozlovskis PL, Bassett AL and Myerburg RJ : Delayed afterdepolarizations and triggered activity induced in feline Purkinje fibers by α -adrenergic stimulation in the presence of elevated calcium levels. *Circulation* 70 : 1074-1082, 1984
- 8) Amerini S, Piazzesi G, Giotti A and Mugelli A : α -Adrenoceptor stimulation enhances automaticity in barium-treated cardiac Purkinje fibers. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 270 : 97, 1984
- 9) Fedida D, Shimoni Y and Giles WR : A novel effect of norepinephrine on cardiac cells is mediated by α_1 -adrenoceptors. *Am J Physiol* 256 : H1500-H1504, 1989
- 10) Vassalle M and Carpentier R : Overdrive excitation : Onset of activity following fast drive in cardiac Purkinje fibers exposed to norepinephrine. *Pflugers Arch.* 332 : 198-205, 1972
- 11) Cranefield PF and Aronson RS : Initiation of sustained rhythmic activity by single propagated action potentials in canine cardiac Purkinje fibers exposed to sodium-free solution or to ouabain. *Circ Res* 34 : 477-481, 1974
- 12) Davis LD : Effects of changes in cycle length on diastolic depolarization produced by ouabain in canine Purkinje fibers. *Circ Res* 32 : 206-214, 1973
- 13) Ferrier GR, Saunders JH and Mendez C : A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetylcholine. *Circ Res* 32 : 600-609, 1973
- 14) Hogan PM, Wittenberg SM and Klocke FJ : Relationship of stimulation frequency to automaticity in the canine Purkinje fiber during ouabain administration. *Circ Res* 32 : 377-383, 1973
- 15) Karagueuzian HS and Katzung BG : Relative inotropic and arrhythmogenic effects of five cardiac steroids in ventricular myocardium : Oscillatory afterpotentials and the role of endogenous catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 218 : 348-356, 1981
- 16) Valenzuela F and Vassalle M : Interaction between overdrive excitation and overdrive suppression in canine Purkinje fibers. *Cardiovasc Res* 17 : 608-619, 1983
- 17) Cranefield PF : Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res* 41 : 415-423, 1977
- 18) Eisner DA and Lederer WJ : Inotropic and arrhythmogenic effects of potassium depleted solutions on mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 294 : 255-277, 1979
- 19) Hiraoka M, Okamoto Y and Sano Y : Oscillatory afterpotentials in dog ventricular muscle fibers. *Circ Res* 48 : 510-518, 1981
- 20) Deitmar JW and Ellis D : The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibers during inhibition and reactivation of the Na-K pump. *J Physiol* 284 : 241-259, 1978
- 21) Lee CO, Kang DH, Sokol JH and Lee KS : Relation between intracellular Na ion activity and ten-

- sion of sheep cardiac Purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain. *Biophys J* 29 : 315-330, 1980
- 22) Lederer WJ and Tsien RW : Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibers. *J Physiol(Lond)* 263 : 73-100, 1976
 - 23) Arlock P and Katzung BG : Effects of sodium substitutes on transient inward current and tension in guinea pig and ferret papillary muscle. *J Physiol (Lond)* 360 : 105-120, 1985
 - 24) Kass RS, Tsien RW and Weingart R : Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. *J Physiol(Lond)* 281 : 209-226, 1978
 - 25) Colquhoun D, Neher E, Reuter E and Stevens CF : Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature, London* 294 : 752-754, 1981
 - 26) Ferrier GR and Moe GI : Effect of calcium acetylstrophanthidin induced transient depolarization in canine Purkinje tissue. *Circ Res* 33 : 508-515, 1973
 - 27) Rosen MR and Danilo P : Effects of tetrodotoxin, lidocaine, verapamil, and AHR-2666 on ouabain-induced delayed afterdepolarizations in canine Purkinje fibers. *Circ Res* 46 : 117-124, 1980
 - 28) Endoh M : Myocardial α -adrenoceptors : multiplicity of subcellular coupling processes. *Asia Pacific J Pharmacol* 6 : 171-186, 1991
 - 29) Ledda F and Marchetti P : Electrophysiological effects of phenylephrine on Purkinje fibers of sheep heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 196 : 117, 1972
 - 30) Giotti A, Ledda F and Mannaioni PF : Effects of noradrenaline and isoprenaline, in combination with α - and β -receptor blocking substance, on the action potential of cardiac Purkinje fibers. *J Physiol(London)* 229 : 99, 1973
 - 31) Rosen MR, Hordof AJ, Ilvento JP and Danilo P Jr : Effects of adrenergic amines on electrophysiological properties and automaticity of neonatal and adult canine Purkinje fibers. Evidence for α - and β -adrenergic actions. *Circ Res* 40 : 390, 1977
 - 32) Endoh M, Wagner J and Schumann HJ : Influence of temperature on the positive inotropic effects mediated by α - and β -adrenoceptors in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 287 : 61, 1975
 - 33) Miura Y, Inui J and Imamura H : α -Adrenoceptor-mediated restoration of calcium dependent potential in the partially depolarized rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol* 301 : 201, 1978
 - 34) Whalen DA, Hamilton DG, Canote, CE and Jennings, RB : Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. *Am J Pathol* 74 : 381, 1984
 - 35) Nayler WG, Ferrari R and Williams A : Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol* 46 : 242, 1980
 - 36) Sharma AD, Saffits JE, Lee BI, Sobel BE and Corr PB : α -Adrenergic-mediated accumulation of calcium in reperfused myocardium. *J Clin Invest* 72 : 802, 1983
 - 37) Sheridan DJ, Penkoske PA, Sobel BE and Corr PB : α -Adrenergic contributions to dysrhythmia during myocardial ischemia and reperfusion in cats. *J Clin Invest* 65 : 161, 1983