

# Vanadate가 심근막을 통한 $Ca^{++}$ 의 유입 및 유출에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학교실

박 영 식 · 안 덕 선 · 강 두 희

= Abstract =

## Effects of Vanadate on the Calcium Flux of Cardiac Muscle

Young Shick Park, Duck Sun Ahn and Doo Hee Kang

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

Since it was proposed that vanadate may be an "ideal endogenous regulator of the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity (Cantley et al, 1979), vanadate has been a subject of intensive research and a variety of its physiological effects have been described (Nechay, 1984).

In isolated guinea pig heart muscle vanadate shows a positive inotropic effect on ventricular muscle, while it induces a negative inotropic effect on atrial muscle. But its underlying mechanism has not been elucidated so far.

Therefore, in this study the flux rates of calcium ion into and from guinea pig heart muscle were measured to throw some light on the underlying mechanism, because those rates have been known to be closely related to the cardiac contractility and the results are summarized as follows:

1) Calcium efflux rates from the intracellular  $Ca^{++}$  pool (compartment 4) of both guinea pig left atrium and right ventricle were significantly reduced by vanadate and their pool sizes were significantly increased by vanadate.

2) The magnitude of calcium influx into left atrium was reduced by vanadate, while the magnitude of calcium influx into right ventricle was not affected by vanadate.

From these results, it may be concluded that the positive inotropic effect of vanadate on the ventricular muscle was due to a reduced efflux rate of calcium ion and its negative inotropic effect on atrial muscle was resulted from a reduced influx of calcium ion.

### 서 론

Vanadate가  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase의 "endogenous regulator"로서 처음 알려진 아래 (Beaugé 및 Glynn, 1977; Hudgins 및 Bond, 1977; Cantley 등, 1979) 그의 생리, 생화학적 효과에 관해 많은 보고가 있었으며 (Balfour 등, 1978; Faller 등, 1982; Dantzig 및 Goldman, 1985) 특히 심근에 있어서 그의 수축력에 미치는 vanadate의 영향에 관해 많은 연구가 이루어졌다

(Hackbarth 등, 1978; Borchard 등, 1979; Bruckner 등, 1980).

그런데 vanadate는 사용한 실험동물의 종류나 혹은 같은 실험동물에서도 사용된 심근 조직부위에 따라 심근 수축력을 증가시키거나 혹은 저하시키는 등의 이상한 양상을 보여주었다 (Borchard 등, 1979; Takeda 등, 1980). 즉 분리된 심실근 절편의 경우는 그의 수축력이 vanadate에 의해 현저히 증가됨이 보고되었으며 (Borchard 등, 1979; Takeda, 1980) 이같은 수축력 증가에 대한 기전으로 i) vanadate의  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase

에 대한 억제작용이 제시되었으나(Myers 및 Boerth, 1980), 수축력을 증가시켜 주는 vanadate의 농도에서 vanadate에 의한  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase의 억제작용이 나타나지 않는다는 반론이 보고되었다(Werdan 등, 1980; Takeda 등, 1980; Aiton 및 Cramb, 1985). ii) Adenylate cyclase에 대한 촉진 작용이 제시되었으나(Schwabe 등, 1979; Hackbarth 등, 1980)이 역시 수축력이 증가되는 vanadate 농도에서 adenylate cyclase의 촉진 작용이 나타나지 않았다(Takeda 등, 1980; Aiton 및 Cramb, 1985). 반면에 고양이나 guinea pig의 분리된 심방근 절편의 경우 vanadate에 의해, 심실근 절편에서와는 달리, 현저한 수축력 저하 현상이 나타나는데, 이 경우 심방근 세포의 활동전압의 기간이 함께 감소되는 현상이 보고되었다(Borchard 등, 1979; Takeda 등, 1980). 따라서 심방근 절편에서 보이는 수축력 저하 현상의 기전으로 활동전압의 기간중에 세포 밖에서 세포 내로 들어오는  $\text{Ca}^{++}$  유입량이 vanadate에 의해 감소되어 나타난다고 추측하였으나 이를 뒷받침할 직접적인 실험적 증거는 제시되지 못하였다.

이같이 vanadate가 심근 수축력에 다양한 영향을 끼침이 보고되었으나 이러한 심근 수축력 변화의 기전에 대한 만족할 만한 설명은 아직 이루어지지 않았다.

그런데 심근의 수축력은 심근 세포의 흥분—수축 과정에서 세포내  $\text{Ca}^{++}$ (activator  $\text{Ca}^{++}$ )이 수축단백질과 결합하여 나타나게 되는 데(Fozzard, 1977; Fabiato 및 Fabiato, 1979) 이같은 세포 내 activator  $\text{Ca}^{++}$ 의 양은 세포막을 통한  $\text{Ca}^{++}$ 의 이동량과 밀접한 관계를 갖게된다(Gibbons 및 Fozzard, 1975; Marban 및 Tsien, 1982). 즉  $\beta$ -agonist를 사용하여 심근 세포 내로의  $\text{Ca}^{++}$  유입량을 증가시켜 주거나(Reuter 및 Scholz, 1977; Fleckenstein, 1983) 혹은  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$  exchange process에 의한  $\text{Ca}^{++}$ 의 유출량을 ouabain을 이용하여 간접적으로 억제시켜 주는 경우, 심근 세포 내의 activator  $\text{Ca}^{++}$ 의 양이 증가되어 이 결과 심근 수축력이 증가됨이 보고되었다(Blinks 등, 1982; Lee 및 Dagostino, 1982; Marban 및 Tsien, 1982). 또 acetylcholine을 사용하거나 혹은  $\text{Ca}^{++}$  channel blocker를 사용하여 심근 세포 내로의  $\text{Ca}^{++}$  유입량을 감소시켜 주는 경우 심근 수축력의 크기가 현저히 감소됨이 보고되었다(Furchgott 등, 1960; Hille, 1984; Snyder 및 Reynolds, 1985).

따라서 본 실험에서는 vanadate에 의해 수축력이 증가되는 guinea pig 심실근 조직과 수축력이 저하되는 guinea pig 심방근 조직에서  $\text{Ca}^{++}$ 의 유입 및 유출에 미치는 vanadate의 영향을  $\text{Ca}^{++}$ -selective electrode를 이용하여 측정함으로써 심근 수축력에 미치는 vanadate의 작용 기전의 일부를 살펴보고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

체중 300 g 내외의 guinea pig을 암·수 구별 없이 사용하였고 실험용액으로는 Krebs-Henseleit(KH) 용액을 사용하였다( $\text{NaCl}$ , 118;  $\text{NCl}$ , 3.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 27;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0; Glucose, 11.1 mM) 또 vanadate (Sigma)를 필요에 따라 KH 용액에 첨가하여 사용하였다.

### 2. 표본제작

Guinea pig의 두부를 강타한 후 심장을 신속히 적출하여 이를 95%  $\text{O}_2$ 와 5%  $\text{CO}_2$ 로 산소화된 KH 용액에 넣은 후 폭 2~3 mm, 길이 8~10 mm가 되도록 좌심방 및 우심실 절편을 만들어서 사용하였다.

### 3. 장력측정

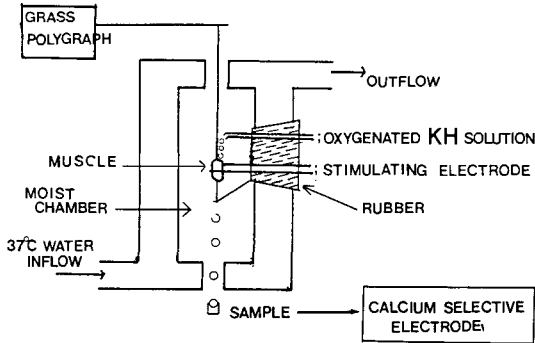
심방 및 심실근 절편의 양끝을 실로 묶은 후 이의 한 끝을 이중벽 속을 37°C의 온수가 관류하는 moist chamber의 바닥에 고정시켰고 다른 한 끝은 force transducer (FT-03)에 연결하여 이들의 수축력을 chart recorder(Grass DPCPB polygraph)에 기록하였다(제 1 도).

이같이 chamber내에 근절편을 고정된 후 95%  $\text{O}_2$ 와 5%  $\text{CO}_2$ 로 산소화된 KH 용액의 방울이 근절편 위로 떨어지도록 점적관류하였고 local stimulator를 이용하여 역치전압보다 10% 큰 전압과 1 Hz의 자극빈도로 근절편을 자극하면서 그의 수축력이 평형상태에 이를때까지 계속 자극하였다. 근조직에 점적된 KH 용액은 다시 moist chamber 아래로 떨어지게 되며 필요에 따라 이를 채집하였다.

### 4. Calcium 유출량의 측정

정상 KH 용액으로 근절편을 점적관류시키면서 근절편

—박영식 외 2인 : Vanadate가 심근막을 통한  $Ca^{++}$ 의 유입 및 유출에 미치는 영향—



제 1 도. Schematic diagram of experimental set-up.

제 1 표. The compositions of the  $Ca^{++}$ -selective electrode testing solutions\*

pCa	CaCl <sub>2</sub>	CaEGTA	EGTA	pH buffer*
2	10	—	—	—
3	1	—	—	—
4	0.1	—	—	—
5	(0.01)	9.62	0.38	20
6	—	7.16	2.84	20
7	—	2.00	8.00	20
8	—	0.24	9.76	20

All concentrations are in mM.

\*Imidazole is used as buffer to maintain pH 7.0.

\*The experimental calibration solutions are made with the KH solution without  $HCO_3^-$  buffer.

이 그의 제작과정에서 발생한 손상에서 일부 회복되도록 한 후, 점적액을 calcium이 없는 KH 용액으로 바꾸어 점적관류시키면서 이때의 수축력의 변화를 polygraph에 기록하였고 근절편에서 떨어지는 유출액을 2초간격으로 받아 이 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도를  $Ca^{++}$ -selective elect-

rode를 이용하여 측정하였다(ECa). 이같이 측정된  $Ca^{++}$  농도를 semilog paper에 도시하여 이를 Riggs(1963)의 방법에 준하여 compartment analysis를 시행하였다. 이후 vanadate를 점적관류액에 첨가한 후 같은 조작을 반복하여 vanadate가  $Ca^{++}$  유출에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 5. Calcium 유입량의 측정

근절편의 수축력이 평형상태에 도달한 후 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜 근수축력이 사라지게 한 후 density gradient former(Beckman 회사제)를 이용하여 점적관류액 내의  $Ca^{++}$  농도를 0에서 1mM까지 연속적으로 증가시켜 주면서 이때의 수축력의 변화를 기록하였고 유입액과 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도를 측정하여 이 농도차와 유출액량으로부터  $Ca^{++}$  유입량을 산출하였다. 이후 점적관류액에 vanadate를 첨가한 후 같은 조작을 반복하여 vanadate가  $Ca^{++}$  유입에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 6. Calcium selective electrode의 작성과 보정

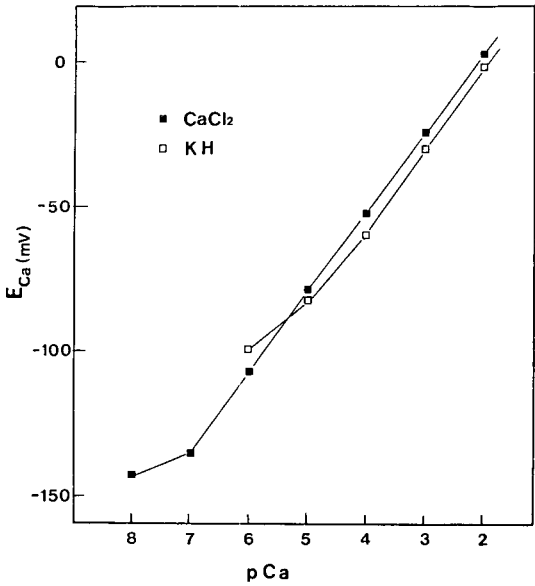
a) Calcium selective electrode의 작성 : Borosilicate glass capillary (WPI)를 vertical puller (David Kopf Instrument)로 사용하여 tip diameter가 1  $\mu$ m 정도의 glass microelectrode로 만들었다. 이 electrode들을 그의 tip이 위로 가도록 teflon film의 구멍에 고정한 후, film과 electrode를 유리병 위에 위로 올려놓았다.

이후 이들을 200°C의 oven내에 30분이상 두어 electrode 내부의 습기를 제거한 후, 유리병 속에 silane 용액(dimethyl dichlorosilane)을 점적하고 15분동안 200°C에서 가열시켜 electrode 내부가 silane vapor에

제 2 표. Effect of vanadate on the  $Ca^{++}$  pool size and its efflux rate from guinea pig left atrium

	Control		Vanadate (20 $\mu$ M)	
	Area	Efflux rate constant	Area	Efflux rate constant
Compartment 1	90.5 $\pm$ 9.5	11.8 $\pm$ 0.4	10.6 $\pm$ 0.2	101.8 $\pm$ 15.2
Compartment 2	73.1 $\pm$ 10.3	0.82 $\pm$ 0.04	80.7 $\pm$ 7.2	0.7 $\pm$ 0.14
Compartment 3	135.3 $\pm$ 14.8	0.44 $\pm$ 0.1	178.3 $\pm$ 34.1	0.43 $\pm$ 0.06
Compartment 4*	1,226.5 $\pm$ 165.5	0.14 $\pm$ 0.01	2,059 $\pm$ 191.8	0.08 $\pm$ 0.01

\*P<0.05 between means of control and vanadate group. All values represent mean $\pm$ standard error



제 2 도. Standard calibration curve for calcium selective electrode.

표준시험용액을 CaCl<sub>2</sub>만 사용하여 만든 경우 (■) pCa=7까지 전형적인 Nernstian response를 보였으나, KH 용액을 사용하여 표준시험용액을 만든 경우에는 (□) pCa=6에서 부터 양이온(주로 Na<sup>+</sup>)에 의한 간섭효과가 나타났다.

의해 도장되도록 한다(Tsien 및 Rink, 1980).

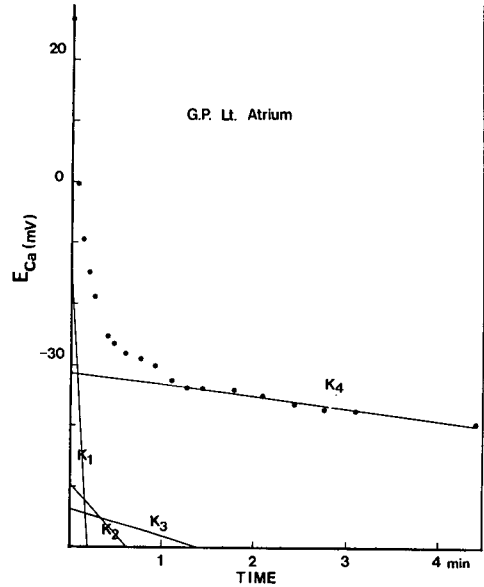
이같이 hydrophobic coating이 된 electrode의 내부를 100 mM KCl+10 mM CaCl<sub>2</sub> 용액으로 채워주면서 electrode tip의 일부를 잘라 그의 tip diameter가 10 μm 내외가 되도록 만들었다. 이후 음압을 이용하여 tip 내부에 calcium exchanger resin(10% ETH, 1% sodium tetraphenyl borate, 89% o-nitrophenyl-octyl-ether)를 빨아들였으며 resin의 길이는 1 mm 내외가 되도록 하였다.

**b) Calcium selective electrode의 보정 :** 표준시험용액(제2표)을 이용하여 Ca<sup>++</sup>-selective electrode의 성능을 관찰하였고, 또 이 표준시험용액으로 표준곡선(제2도)을 작성하여 유출액에서 측정된 Ca<sup>++</sup> 농도를 이를 통해서 환산, 표준화하였다.

### 실 험 결 과

#### 1. 심방근으로 부터의 Ca<sup>++</sup> 유출에 미치는 vanadate의 영향

Guinea pig 심방근 절편을 calcium이 없는 KH 용액



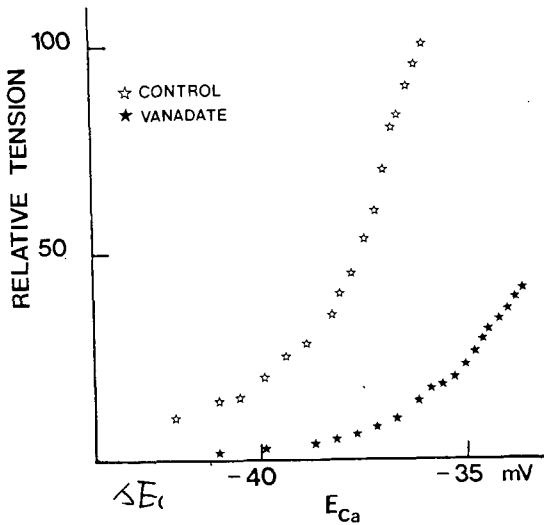
제 3 도. Calcium washout curve from guinea pig left atrium.

Guinea pig 좌심방 절편을 역치전압보다 10% 큰 전압과 1 Hz의 자극 빈도로 자극하여 수축력이 평형상태에 도달하게 한 후 근절편을 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜서 얻은 Ca<sup>++</sup> 세척곡선이다.

으로 점적관류시켜 얻은 Ca<sup>++</sup> 유출곡선을(제3도) 분석하여 4개의 compartment를 얻을 수 있었고 이들 compartment의 소실율과 면적은 제2표와 같다.

이후 관류액을 정상 KH 용액으로 바꾸어 점적관류시키면서 수축력의 크기가 처음 상태로 회복된 것을 관찰한 후 vanadate(20 μM)를 점적관류액에 첨가하여 수축력의 크기가 대조군의 40% 정도로 감소되는 것을 관찰한 후 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜 이의 Ca<sup>++</sup> 유출곡선을 얻었고 이를 분석해 본 결과 표재성 Ca<sup>++</sup>pool(compartment 1, 2 및 3)의 크기나 이들로 부터의 Ca<sup>++</sup> 유출율은 vanadate에 의해 영향을 받지않았으나 심재성 Ca<sup>++</sup>pool(compartment 4)로 부터의 Ca<sup>++</sup> 소실율은 대조군에 비하여 현저히 감소하였고 또 그 compartment의 크기는 증가하였다(P>0.05).

이때 유출액 내의 Ca<sup>++</sup> 농도와 그 때의 수축력사이의 상관 관계를 살펴보면 점적관류액에 vanadate를 첨가시켰을 경우 같은 유출액 내의 Ca<sup>++</sup> 농도에서 대조군에 비해 수축력의 크기가 현저히 작음을 알수 있다



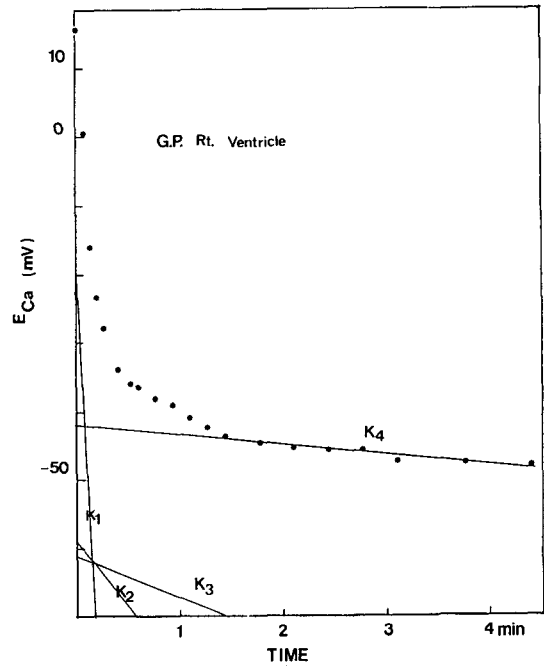
제 4 도. Relationship between calcium concentration of effluent from and contractility of guinea pig left atrium.

Guinea pig 좌심방 절편을 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시키면서 얻은 수축력 크기의 변화를 세로축에 표시하였고 이때의 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도의 변화를 가로축에 표시하였다. 각각의 수축력의 크기는 정상 KH 용액으로 점적관류시켰을 때의 대조군의 수축력의 크기를 100으로 하여 수축력의 크기들을 그의 %로 표시하였다.

(제4도).

## 2. 심실근으로 부터의 $Ca^{++}$ 유출에 미치는 vanadate의 영향

Guinea pig 심실근 절편을 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜 얻은  $Ca^{++}$  세척곡선(제5도)을 분석한 결과 심방근에서와 같이 4개의 compartment를 얻



제 5 도. Calcium washout curve from guinea pig right ventricle

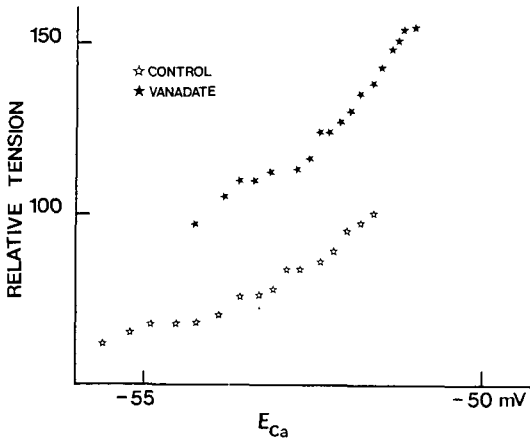
제3도에서와 같은 방법으로  $Ca^{++}$  유출곡선을 얻었다.

을 수 있었으며 이들 compartment의 소실율과 면적을 제3표에 나타내었다. 즉 심방근에서와 같은 방법으로 점적관류액에 vanadate( $200 \mu M$ )을 첨가하여 근수축력의 크기가 대조군에 비해 50% 이상 증가한 것을 관찰한 후 calcium이 없는 KH 용액으로 바꾸어 점적관류시켜 그의  $Ca^{++}$  세척곡선을 얻었고, 이를 분석해 본 결과 심방근에서와 같이 compartment 1, 2 및 3의

제 3 표. Effect of vanadate on the  $Ca^{++}$  pool size and its efflux rate from guinea pig right ventricle

	Control		Vanadate ( $20 \mu M$ )	
	Area	Efflux rate constant	Area	Efflux rate constant
Compartment 1	71.3±4.7	13.3±1.4	84.7±8.1	10.4±0.8
Compartment 2	107±45.6	0.72±0.28	89±12.5	1.64±0.28
Compartment 3	151.7±57.6	0.48±0.04	204.3±35.7	0.66±0.12
Compartment 4*	1,608±102.3	0.14±0.001	3,273±634.7	0.08±0.006

\* $P < 0.05$  between means of control and vanadate group. All values represent mean±standard error



제 6 도: Relationship between calcium concentration of effluent from and contractility of guinea pig right ventricle

제4도와 같은 방법으로 유출액의  $Ca^{++}$  농도와 수축력 사이의 상관관계를 도시하였다.

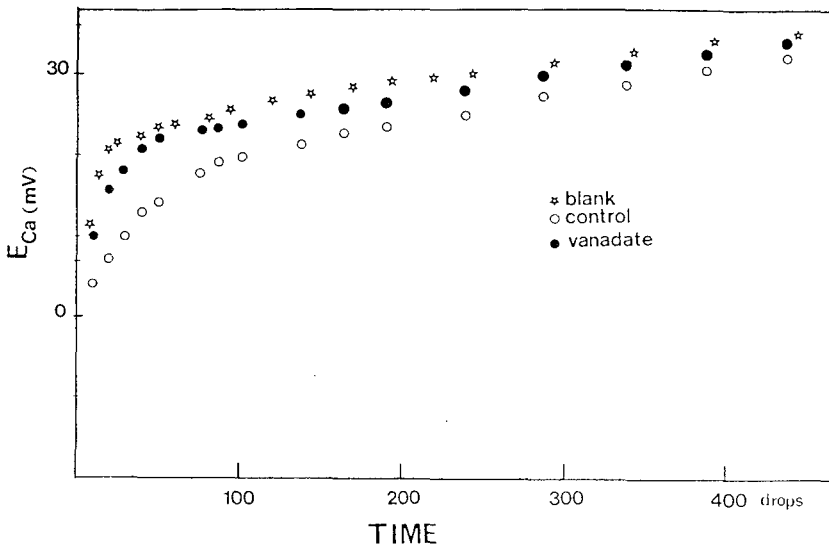
pool size나 이틀로부터의  $Ca^{++}$  유출율은 vanadate에 의하여 영향을 받지 않았으나 compartment 4로 부터의  $Ca^{++}$  유출율은 대조군에 비해 감소하였고 그 compartment의 크기는 증가하였다( $P < 0.05$ ).

이때 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도와 수축력 사이의 상관관계를 살펴보면 같은 유출액의  $Ca^{++}$  농도에서 vanadate 첨가군의 경우 그 관계곡선이 좌방으로 이동하여 대조군보다 수축력의 크기가 증가한 것을 관찰할 수 있었다(제6도).

### 3. 심방근 내로의 $Ca^{++}$ 유입에 미치는 vanadate의 영향

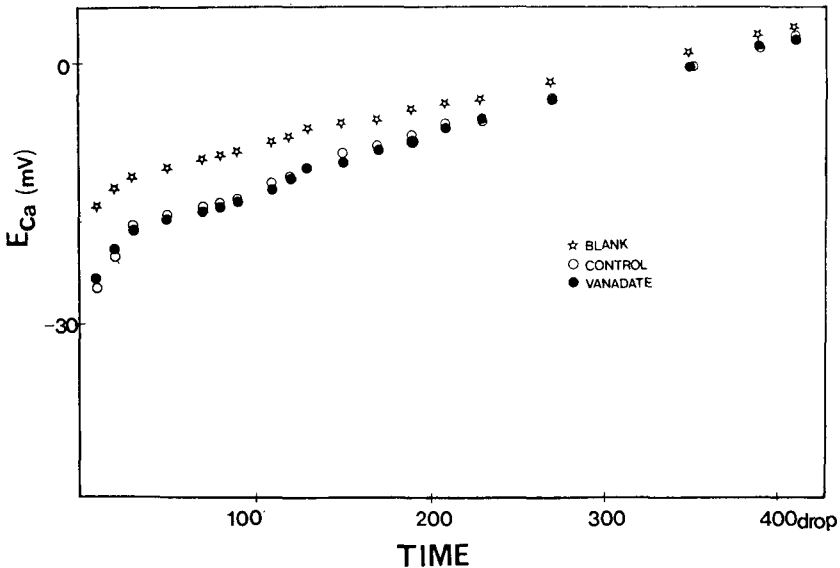
Guinea pig 심방근 절편을 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜 그의 수축력이 사라지게 한 후 점적관류액 내의  $Ca^{++}$  농도를 0 mM에서 1 mM까지 연속적으로 증가시켜 주면서 이때의 유출액의  $Ca^{++}$  농도를 측정하여 얻은 조직유출액 내의  $Ca^{++}$  농도 변화를 제7도에 표시하였다.

이중 조직을 거치지 않고 density gradient former로부터 직접 유출되는 유출액의  $Ca^{++}$  농도 변화를 나타낸 것이 blank 인데 이 blank 곡선과 조직을 점적관류하여 얻은 곡선(control 및 vanadate)사이의 차이가 심방근 조직으로 이동된  $Ca^{++}$  양의 크기를 나타낸다. 점적관류액에 vanadate(20  $\mu$ M)를 첨가하여 같은 방법으로  $Ca^{++}$  유입에 미치는 vanadate의 영향을 살



제 7 도. Effect of vanadate on the change in  $Ca^{++}$  concentration of effluent of guinea pig left atrium.

Density gradient former를 이용하여 점적관류액 내의  $Ca^{++}$  농도를 0 mM에서 1 mM까지 연속적으로 증가시켜 주면서 이때 조직을 거처서 떨어지는 유출액의  $Ca^{++}$  농도( $\circ$ )와 density gradient former에서 직접 떨어지는 유출액의  $Ca^{++}$  농도( $\star$ )를 측정하였다. 이들의 농도차와 유출액량을 이용하여 세포내로의  $Ca^{++}$  유입량을 산출하였고, 같은 방법으로 vanadate가  $Ca^{++}$  유입에 미치는 영향을 측정하였다( $\bullet$ ).



제 8 도. Effect of vanadate on the change in  $Ca^{++}$  concentration of effluent of guinea pig right ventricle. 제7도와 같은 방법으로 심실근 내로의  $Ca^{++}$  유입에 미치는 vanadate의 영향을 관찰하였다.

퍼 본 결과 대조군에 비해 유입량이 감소하였음을 알 수 있다.

#### 4. 심실근 내로의 $Ca^{++}$ 유입에 미치는 vanadate의 영향

심방근에서와 같은 방법으로  $Ca^{++}$  유입에 미치는 vanadate(200  $\mu$ M)의 영향을 살펴 본 결과 대조군과 비교시  $Ca^{++}$  유입량에 유의한 차이가 없었다(제8도).

이때 비교의 목적으로 epinephrine(10  $^{-6}$ M)이  $Ca^{++}$  유입에 미치는 영향을 살펴 본 결과 epinephrine에 의해 심실근 내로의  $Ca^{++}$  유입이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(결과는 표시되지 않았음).

#### 고 찰

심근막을 통한  $Ca^{++}$ 의 이동량은 심근 수축력의 크기를 결정짓는 중요한 요소의 하나로서(Gibbons 및 fozzard, 1975; Marban 및 Tsien, 1982) vanadate에 의해 나타나는 심근 수축력의 변화현상 역시 이같은 심근막을 통한  $Ca^{++}$  이동량에 vanadate가 영향을 주어 나타났을 가능성이 있다(Takeda 등, 1980 : 1982). 따라서 본 실험에서는 심근막을 통한  $Ca^{++}$ 의 유입 및

유출에 미치는 vanadate의 영향을 관찰하여 심근 수축력 변화에 대한 vanadate의 작용기전의 일부를 살펴보고자 하였다.

Guinea pig 심실근 절편을 calcium이 없는 KH 용액으로 점적관류시켜서 얻은 유출액의  $Ca^{++}$  농도와 그때의 수축력간의 상관관계를 살펴보면 같은 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도에서 vanadate 첨가군의 경우 대조군에 비해 수축력의 크기가 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었다(제6도). 이같은 결과는 vanadate에 의해 심실근 세포 내의 activator  $Ca^{++}$  양이 증가하였음을 시사해 준다. 그런데 세포 내 activator  $Ca^{++}$ 의 양은, 세포 내로의  $Ca^{++}$  유입이 증가하거나 혹은  $Ca^{++}$  유출이 감소한 경우, 증가되게 되므로 제6도의 결과는 vanadate에 의해  $Ca^{++}$  유입이나  $Ca^{++}$  유출이 변화되었을 가능성을 제시해준다(Marban 및 Tsien, 1982; Fleckenstein, 1983). 따라서 이같은 가능성을 규명해 보기 위하여 심실근 절편으로부터의  $Ca^{++}$  유출곡선을 분석해 본 결과 sarcoplasmic reticulum  $Ca^{++}$ 으로 생각되는 compartment 4(Langer, 1964)로부터의  $Ca^{++}$  유출율이 vanadate(200  $\mu$ M)에 의해 현저히 감소하였고 동시에 그 compartment의 크기는 현저히 증가하였다(제3표). 반면에 심실근내로의  $Ca^{++}$  유입은

vanadate에 의해 영향을 받지 않았다(제8도).

그런데 심근 세포로 부터의  $Ca^{++}$  유출로 주로  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$  exchange process에 의해 이루어지므로(Jundt 등, 1975) vanadate에 의해  $Ca^{++}$  유출이 감소된 결과는  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$  exchange process가 vanadate에 의해 억제되는 것을 시사해 준다. 따라서 vanadate에 의해 나타나는 심실근의 수축력 증가 현상은 vanadate가 심실근으로 부터의  $Ca^{++}$  유출을 억제시켜 심실근 세포 내의 activator  $Ca^{++}$  양이 증가되어 나타나는 결과라고 생각된다.

이에 반하여 vanadate에 의해 수축력이 저하되는 심방근에서, 그의 유출액과 수축력 사이의 상관관계를 살펴보면 같은 유출액 내의  $Ca^{++}$  농도에서 vanadate 첨가군의 경우 대조군에 비해 수축력의 크기가 현저히 작음을 관찰할 수 있다(제4도). 이는 vanadate 첨가군의 경우 대조군에 비해 세포 내 activator  $Ca^{++}$  양이 적음을 시사해 준다. 이때 심방근으로 부터의  $Ca^{++}$  유출곡선을 분석해 본 결과 심실근의 경우와 같이 compartment 4로 부터의  $Ca^{++}$  유출율은 감소하였고 그 compartment의 크기는 증가하였다(제2표). 그러나 심방근 내로의  $Ca^{++}$  유입에 미치는 vanadate(20  $\mu$  M)의 영향을 살펴본 결과 vanadate 첨가군의 경우 대조군에 비해  $Ca^{++}$  유입량이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(제7도).

따라서 심방근에서 보이는 vanadate에 의한 수축력 저하 현상은 심방근 세포 내로의  $Ca^{++}$  유입이 vanadate에 의해 억제되어 나타나는 결과라고 생각되며 이는 다른이들의 보고와도 일치한다(Borchard 등, 1979; Takeda 등, 1980; 1982).

그러나 심실근 내로의  $Ca^{++}$  유입실험에서 vanadate가 심실근 세포 내로의  $Ca^{++}$  유입량에 영향을 끼치지 못한 실험결과와는 아마도 본 실험에서 시행한  $Ca^{++}$  유입량의 측정방법이 정밀치 못하여 나타났을 가능성도 있으므로 이에 대해선  $^{45}Ca$ 를 사용하는 방법등을 이용하여 차후 연구에서 추구하여 불만한 문제라고 생각된다.

### 결 론

Vanadate가 guinea pig 심실근 조직에서는 수축력을

증가시켜주고 심방근 조직에선 수축력 저하를 일으키는 기전의 일부를 규명하고자 이들 심근 절편에서의  $Ca^{++}$  이동량에 미치는 vanadate의 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Vanadate에 의해 좌심방근 및 우심실근의 intracellular  $Ca^{++}$  pool(compartment 4)로 부터의  $Ca^{++}$  유출율은 감소하였고 그의 pool size는 증가하였다( $P < 0.05$ ).

2) Vanadate에 의해 심방근 내로의  $Ca^{++}$  유입량은 감소하였으나 심실근 내로의  $Ca^{++}$  유입량은 영향을 받지 않았다.

이상과 같은 결과로 보아 guinea pig 심실근에서의 수축력 증가현상은 주로 vanadate에 의해 심실근으로 부터의  $Ca^{++}$  유출이 감소하여 나타난다고 생각되며 심방근에서의 수축력 감소는 주로 vanadate에 의한  $Ca^{++}$  유입량 감소에 기인한다고 생각된다.

### REFERENCES

Aiton, J.F. and Cramb, G: The effects of vanadate on rabbit ventricular muscle adenylate cyclase and sodium pump activities. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 1543-1548, 1985.

Balfour, W.E., Grantham J.J. and Glynn, I.M.: Vanadate-stimulated natriuresis. *Nature.*, 275:768, 1978.

Beauge L.A. and Glynn I.M.: A modifier of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase in commercial ATP. *Nature.*, 268:355-356, 1977.

Blinks, J.R., Wier, W.G., Morgan, J.P. and Hess, P.: *Advances in pharmacology and therapeutics II. Vol 3, Cardiorenal and Cell Pharmacology. Pergamon Press, Ltd., Oxford p. 205-216, 1982.*

Borchard, U., Föx, A.A.L., Greeff, K. and Schlieper, P.: Negative and positive inotropic action of vanadate on atrial and ventricular myocardium. *Nature*, 279:339-341, 1979.

Brückner, R., Schmitz, W., Scholz, H., Schumacher, A., Erdmann, E., Krawietz, W. and Werdan, K.: Negative inotropic effect of vanadate in ventricular myocardium in the presence of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine or isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 315:147-153, 1980.

Cantley, J.C.Jr., Cantley, L.G. and Josephson, L.: Characterization of vanadate interactions with  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *Mechanistic and regulatory implica-*



- tions. *J. Biol. Chem.*, 253:7361-7368, 1979.
- Dantzig, J.A. and Goldman, Y.E.: *Suppression of muscle contraction by vanadate: mechanical and ligand binding studies on glycerol-extracted rabbit fibers.* *J. Gen. Physiol.*, 86:305-327, 1985.
- Fabiato, A. and Fabiato, F.: *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling.* *Ann. Rev. Physiol.*, 41: 473-484, 1979.
- Faller, L., Jackson, R., Malinowska, D., Mukidjam, E., Rabon, E., Saccomani G., Sachs G., Smolka A.: *Mechanistic aspects of gastric ( $H^+ + K^+$ ) - ATPase.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 402:146-163, 1982.
- Fleckenstein, A.: *Calcium antagonism in heart and smooth muscle, experimental facts and therapeutic prospects.* *John Wiley & Sons*, p. 76-78, 1983.
- Fozzard, H.A.: *Heart, excitation-contraction coupling.* *Ann. Rev. Physiol.*, 39:201-220, 1977.
- Furchgott, R.F., Sleator, W. Jr. and de Gubareff, T.: *Effects of acetylcholine and epinephrine on the contractile strength and action potential of electrically driven guinea pig atria.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 129:405-416, 1960.
- Gibbons, W.R. and Fozzard, H.A.: *Relationship between voltage and tension in sheep cardiac purkinje fiber.* *J. Gen. Physiol.*, 65:367-384, 1975.
- Hackbarth, I., Schmitz, W., Scholz, W., Erdmann, E., Krawietz, W. and Philipp, G.: *Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle.* *Nature*, 275:67, 1978.
- Hackbarth, I., Schmitz, W., Scholz, H., Wetzell, E., Erdmann E., Krawietz, W. and Philipp, G.: *Stimulatory effect of vanadate on cyclic AMP levels in cat papillary muscle.* *Biochem. Pharmacol.*, 29:1429-1432, 1980.
- Hille, B.: *Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Associates Inc*, p. 82-84, 1984.
- Hudgins, P.M. and Bond, G.H.: *( $Mg^{2+} + K^+$ ) - dependent inhibition of  $Na^+$ ,  $K^+$  - ATPase due to a contaminant in equine muscle ATP.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77:1023, 1977.
- Jandhyala, B.S. and Hom, G.J.: *Physiological and pharmacological properties of vanadium.* *Life Sci.*, 33:1325-1340, 1983.
- Jundt, H., Porzig, H., Reuter, H. and Stucki, J.W.: *The effects of substances releasing intracellular calcium ions on sodium-dependent calcium efflux from guinea pig auricles.* *J. Physiol.*, 216:229-253, 1975.
- Langer, G.A.: *Kinetic localization of calcium distribution in ventricular muscle of the dog.* *Cir. Res.*, 15:393-405, 1964.
- Lee, C.O. and Dagostino, M.: *Effect of strophanthidin on intracellular sodium ion activity and twitch tension of constantly driven canine cardiac purkinje fiber.* *Biophys. J.*, 40:185-198, 1982.
- Marban, E. and Tsien, R.W.: *Enhancement of calcium current during digitalis inotropism in mammalian heart: positive feedback regulation by intracellular calcium.* *J. Physiol.*, 329:589-614, 1982.
- Myers, T.D. and Boerth, R.C.: *Interaction of ouabain and vanadate with  $Na^+$ ,  $K^+$  - ATPase and isolated cardiac muscles.* *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 96:39-46, 1980.
- Nechay, B.R.: *Mechanism of action of vanadium.* *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24:501-524, 1984.
- Reuter, H. and Scholz, H.: *The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline.* *J. Physiol.*, 264:49-62, 1977.
- Riggs, D.S.: *The mathematical approach to physiological problems.* *Williams and Wilkins Co.*, Baltimore, Md., USA, 1963.
- Snyder, S.H. and Reynolds, I.J.: *Calcium antagonist drugs. Receptor interactions that clarify therapeutic effects.* *N. Eng. J. Med.*, 313:995-1002, 1985.
- Schwabe, U., Puchstein, C., Hannemann, H. and Sochtig, E.: *Activation of adenylate cyclase by vanadate.* *Nature.*, 277:143, 1979.
- Takeda, K., Akera, K., Yamamoto, S. and Shieh, I.S.: *Possible mechanism for inotropic actions of vanadate in isolated rat and guinea pig heart under conditions which modify calcium pools involved in contractile activation.* *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 222: 132-139, 1982.
- Tsien, R.Y. and Rink, T.J.: *Neutral carrier ion selective microelectrode for measurement of intracellular free calcium.* *Biochim. Biophys. Acta.*, 599:623-638, 1980.
- Werdan, K., Bauriedel, G., Bozsik, K., Krawietz, W. and Erdmann, E.: *Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells: vanadate transport, intracellular binding and vanadate induced changes in beating and in active cation flux.* *Biochim. Biophys. Acta.*, 597:364-383, 1980.