

수축과 활동전압의 Staircase 현상에 대한 Ca-전류 및 세포내 Ca²⁺ 농도 변화의 영향

인하대학교 의과대학 생리학교실 및 서울대학교 의과대학 생리학교실*

박춘옥 · 서인석 · 호원경* · 엄용의* · 김우겸*

(1989년 10월 13일 접수)

= Abstract =

Effects of the Changes in Ca-current and Intracellular Ca-concentration on the Contraction and Action Potential Staircase

Choon Ok Park, In Suk So, Won Kyung Ho,* Yung E Earm* and Woo Gyeum Kim*

*Department of Physiology, College of Medicine, Inha and Seoul National University**

It well known that the magnitude of contraction and the shape of action potential depend upon the stimulation frequency and the duration of resting period (positive and negative staircase). Although the underlying mechanism of the staircase phenomenon is not fully understood, it has been suggested that staircase could be related to the intracellular Ca²⁺ concentration.

In order to elucidate the role of intracellular Ca²⁺ on the contraction and action potential staircases, we examined the effects of 1 mM 4-aminopyridine (4-AP), 0.5 uM verapamil, 1 uM ryanodine, or reduction of extracellular Na concentration to 30% (substituted by equimolar Li⁺) in small atrial strips of the rabbit (3 × 10 mm).

The results obtained were as follows;

1) When the stimulation frequency was increased from 0.1 Hz to 2 Hz, positive staircase of the contraction and elevation of plateau level in action potential were found in control and the conditions of Na reduction and treatments of 4-AP, verapamil and ryanodine.

2) When stimulation frequency returned to 0.1 Hz from 2 Hz stimulation for 1 min, the magnitudes of initial few contractions were larger than that of steady state contraction (post-rest potentiation) except, ryanodine or Na-reduction groups.

3) Negative staircase of contraction was developed in control and 4-AP group at post-rest 0.1 Hz stimulation and the plateau level of the action potential was decreased at the same time. But the reduction of contraction or the plateau level was much smaller in 4-AP group and than in control.

From the above results it can be concluded that contraction and action potential staircase is dependent upon transmembrane Ca²⁺-current and Ca²⁺ release from the SR.

Key Words: Rabbit atrium, Staircase phenomenon, Sarcoplasmic reticulum, Na-Ca exchange

서 론

심근은 자극빈도나 자극양식에 따라 수축력이 변화하므로, non-steady state 자극에 의해 심근 고유

의 inotropic 기전을 밝히고자 많은 연구가 행하여져 왔다. 자극빈도가 증가함에 따라 수축력이 증가하는 현상(frequency inotropy), 조기박동에 의하여 다음 수축의 크기가 강화되는 현상(post-stimulatory potentiation; Woodworth, 1902)은 오래전부터 관심

을 끌어 왔다(Rosin & Farah, 1955; Wohlfart, 1979). 그리고 심근은 자극 양식에 따라 그 수축양상이 달라지며 종에 따라서도 다름을 알게 되었다(Blinks & Koch-Weser, 1961).

수축의 강화현상은 빠른 자극과 휴식 후의 첫번째 자극에서 가장크고, 뒤에 오는 수축에서는 그 크기가 감소하는데, Rosin & Farah (1955)는 이를 수축 강화물질이라고 생각되는 것이 소모되기 때문으로 보았고, Wood등 (1969)은 세포내 Ca 저장고 (SR)의 Ca^{2+} 양이 수축력의 주된 결정인자로서 강화된 수축력의 소실은 SR에서의 회수되는 양보다 세포외로 나가는 Ca의 양이 더 많아 활성 Ca^{2+} 을 잃기 때문이라고 하였다("재순환설"; Morad & Goldmann, 1973). 수축력의 주된 결정인자가 myofilament space로 유리되는 Ca^{2+} 양이라는 사실은 널리 인정되고 있는 바이다(Fozzard, 1977).

Hilgemann (1984, 1986)은 이러한 가설을 직접적으로 확인하기 위해 Ca^{2+} 농도에 민감한 염색물질을 사용하여 세포외 Ca^{2+} transient를 측정하였는데, 세포외 Ca^{2+} transient는 Ca-유입에 의해 감소하고 Ca-유출에 의해 증가하므로, net depletion은 세포내 Ca 저장고에 축적이 됨을 알 수 있다. 이 연구에서 빠른 자극시 세포외 Ca^{2+} 농도가 감소되었고, 휴식 후 첫번째의 자극으로 수축의 강화가 일어날 때는 세포외 Ca^{2+} 농도가 급격히 증가하며, 뒤따라 오는 수축 시에는 점차로 원래의 농도로 돌아가는데, 이때 수축의 크기도 점차 감소하였다.

자극빈도가 증가함에 따라 수축력이 증가하는 positive staircase 현상은 그 기전이 아직 밝혀지지 않았지만, 포유류에서 자극빈도를 증가시키면서 Ca-유입에 관여하는 느린 내향전류를 측정한 결과를 보면, 수축의 증가와 함께 느린 내향전류가 증가한 예도 있으나(Reuter, 1967; Beeler & Reuter, 1970), positive staircase 현상 때 느린 내향전류에 변화가 없거나(Beeler & Reuter, 1970, Ochi & Trautwein, 1971; Trautwein, 1973) 오히려 감소한다는(Gibbons & Forzard, 1975; Reuter, 1973) 보고도 있다. 그러므로 Ca-유입의 증가로써 positive staircase를 설명하기는 어렵다. Fabiato (1985b)는 positive staircase를 Ca^{2+} 이 SR의 release site에 축적되어 자극시 SR의 Ca-유리가 증가되기 때문에 일어

난다고 보았다.

활동전압의 모양도 자극빈도나 자극양식에 따라서 변화를 보이며(Carmeliet, 1977; Boyett & Jewell, 1978), 그 변화양상도 종에 따라 다양하나(Carmeliet, 1977) 이의 변화와 수축의 변화가 함께 연구된 것은 많지 않다. 이에 본 연구에서는 positive와 negative staircase 현상을 세포내 Ca^{2+} 농도를 결정짓는 여러인자-즉 Ca 통로를 통한 Ca-유입, 근장고물(SR)에서의 Ca-유리, Na-Ca 교환기전에 의한 Ca-유출-들에 영향을 주는 4-aminopyridine (4-AP), ryanodine, verapamil을 주었을 때와 세포외 Na^{+} 농도를 감소시켰을 때 수축과 활동전압의 변화를 관찰하고 분석하여 그 기전을 밝혀보고자하였다.

실 험 방 법

1. 심방근 절편

체중 1 kg 내외의 토끼의 후두부를 강타하여 실신시키고 경동맥을 절단하여 실험시킨 후 심장을 적출하였다. 100% 산소로 포화된 실온의 Tyrode 용액이 든 준비용기에서 심실을 절개하여 심장속 혈액을 씻어내고, 심실을 방실연결부위에서 제거하여 심방만을 분리하였다. 상대정맥과 하대정맥을 절개하여 동방결절부분을 노출시킨 다음, 우심방벽을 열어서 하대정맥쪽 심방근을 편평하게 고정시킨 뒤 좌심방을 제거하였다. 그리고 30분~1시간 가량 회복시킨 다음, 면도날로 crista terminalis에서 심방근의 주행 방향에 따라 쪽 1~1.5mm, 길이 3~5 mm되는 절편으로 만들었다. 절편의 양 끝을 무명실 한가닥씩으로 묶었는데, 한쪽 끝은 고리를 만들어 장력변환기(isometric transducer, Havard)에 연결할 수 있게 한 뒤 다시 1시간 가량 실온에서 회복시켰다. 이와 같은 절편준비는 입체현미경(Prior) 시야($\times 14$)에서 하였다.

회복된 절편은 용량 0.5 ml 가량되는 perspex로 된 실험용기에 옮겨 고리가 있는 쪽을 장력변환기에 연결하고, endocardium을 위로 한 수평상태에서 다른 쪽 끝은 가는 핀으로 고정하여 다시 30분 이상 회복시켰다. 이때 실험용액은 100% 산소로 포화된 Tyrode용액으로 온도는 $30^{\circ}C$ 이었고, 관류속도는 0.53 ml/min 이었다.

2. 실험용액

정상 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 포도당 5 mM 이고, pH는 Tris-HCl을 사용하여 7.4가 되도록 만들었다.

Na⁺ 감소용액은 NaCl 대신 동량의 LiCl로 대체하여 Na⁺ 농도가 정상용액의 30%가 되도록 하였다. 다른 용액들은 정상용액에 각각의 약물을 첨가하여 만들었는데, 4-aminopyridine (4-AP)의 경우는 1 mM을, verapamil은 0.5 μM을, ryanodine은 1 μM을 첨가하였다.

3. 실험장치

용액의 관류는 정수압을 이용하였으며 온도는 항온순환기를 사용하여 30°C로 유지하였다.

심방근의 활동전압은 삽입된 미세전극을 통해, 수축은 장력변환기를 통하여 전치증폭기 (preamplifier)를 거쳐 생리기록기 (Device 및 Grass)와 oscilloscope (Nicolet 4094C)에 기록되도록 하였다.

유리미세전극은 가는 유리관을 puller로 뽑아 끝의 지름을 1 μm이하로 만든 후, 3 MΩ KCl을 채워 tip 저항이 30 MΩ 이상이 되는 것을 사용하였다.

자극전극은 백금선 (platinum wire)으로 만들었고, 자극은 자극기 (CFP 8173)로부터 크기가 역치의 1.5 ~ 2배, 자극기간이 0.5 ms인 square pulse를 주었다. 자극전극의 위치는 심방근 절편의 바로 밑에 오도록 설치했다.

4. 심방근의 활동전압과 수축의 기록

절편을 실험용기에서 30분 이상 충분히 회복시킨 뒤, 자극의 크기를 정한 후, 빈도 0.1 Hz의 자극을 주었다. 0.1 Hz에서 일정크기의 수축을 보이면 positive staircase를 보기 위하여 1분 동안 2 Hz의 자극을 주었고, negative staircase를 보기 위하여 1분간 휴식을 시킨 뒤, 다시 0.1 Hz의 자극을 주었다. 이렇게 자극빈도를 달리하여 수축과 활동전압을 기록하여 그변화를 관찰하였다.

Na⁺ 감소용액과 4-AP, verapamil, ryanodine을 첨가한 용액에서도 자극의 빈도를 달리하며 수축과 활동전압을 기록하였다.

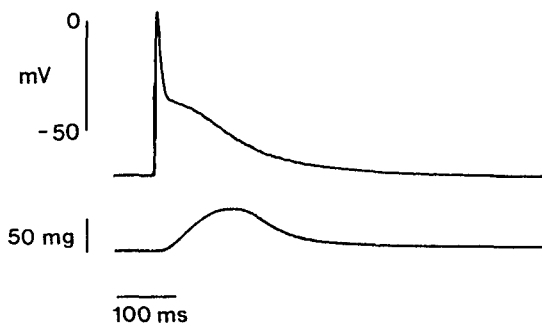


Fig. 1. Typical action potential and contraction at 0.1 Hz stimulation. The action potential shows very fast repolarization and a late low-level plateau with slow terminal repolarization. The late low-level plateau begins at the level of -30 ~ -40 mV.

실험 성적

토끼 심방근에서의 활동전압은 0.1 Hz의 자극에서 특징적으로 재분극이 두개의 시기 (phase)로 나타났다. 즉 재분극은 초기의 빠른 재분극 시기와 upstroke시작으로 부터 12~20 ms 후에 -30~-40 mV에서부터 재분극이 느려지며 생기는 후반부 plateau 시기로 나뉘어졌다 (Fig. 1). 이런 특징은 다른 연구자들의 보고 (Tanaka et al, 1967; Hilgemann, 1986; Giles & Imaizumi, 1988)와도 잘 일치하였다.

0.1 Hz에서 2 Hz로 자극빈도를 증가시키면 처음에는 수축이 억제되는 듯하다가 곧 점차로 크기가 증가하는 positive staircase 현상이 나타났다 (Fig. 2A). 이때의 활동전압의 변화는 재분극시기에서 초기의 빠른 부분이 느려지며 높은 plateau가 형성되고, 활동전압 전체의 기간은 짧아졌다 (Fig. 2B 윗그림). 자극빈도를 증가시켰을 때 활동전압의 이런 변화는 두세번의 자극에 의해 거의 항정상상태가 되었으나, 수축의 크기는 자극이 지속되는 1분간 계속 증가하였다 (Fig. 2A).

1분간 휴식시킨 후 다시 0.1 Hz의 자극을 줄 때는 수축의 크기가 크게 증가하는 강화현상을 보였는데, 첫번째의 수축이 가장 컸으며, 다음에 오는 수

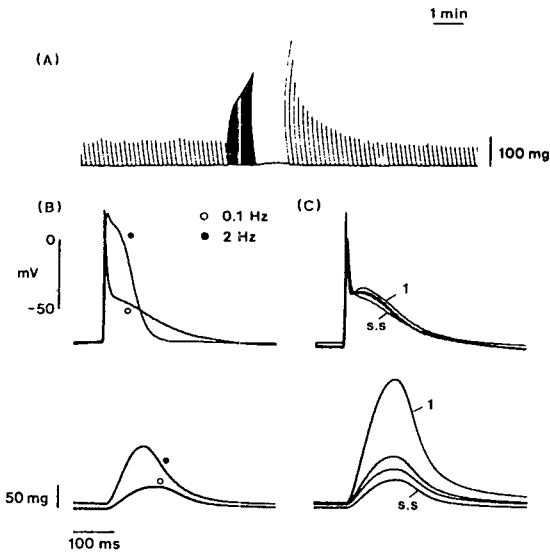


Fig. 2. Effects of the stimulus frequency on the contractions and the action potentials. A) Contractions were increased with increase of the frequency from 0.1 Hz to 2 Hz (positive staircase) and post-stimulatory potentiation was decayed during 0.1 Hz stimulation after 1 min-rest (negative staircase). B) Superimposed action potentials (upper trace) and contractions (lower trace) at 0.1 Hz (○) and 2 Hz (●). C) Post-rest change in action potentials and contractions. Late low-level plateau shows negative staircase. (s.s: steady-state 1: first post-rest stimulation).

축은 크기가 점차로 감소하는 negative staircase를 보였다. 이때 수축의 감소는 휴식 후 처음 두세번의 자극에 의하여 가장 많이 일어났다 (Fig. 2A). 활동전압에서는 느린 재분극기의 plateau가 수축에서처럼 점차로 낮아지는 negative staircase를 보였는데, 특히 휴식 후 첫번째의 활동전압은 초기의 빠른 재분극 과정후에 다시 저분극 되었다가 느리게 재분극 되는 모습을 보였다 (Fig. 2C 윗그림).

1. 자극빈도의 증가와 4-AP

4-aminopyridine (4-AP)은 일과성 외향전류를 억제하는 약물로 알려져 있다 (Giles & Imaizumi, 1988). 일과성 외향전류는 활동전압의 재분극 과정에 참여하여 빠른 재분극의 형성에 관여한다 (Di-Francesco & Noble, 1985).

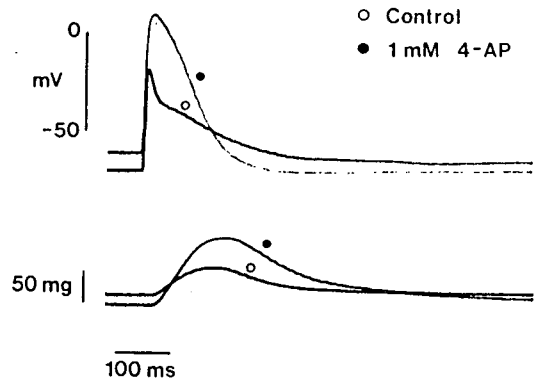


Fig. 3. Superimposed records of action potential and contraction at 0.1 Hz stimulation in normal (○) and 1 mM 4-AP (●) Tyrode solutions. Early rapid repolarization of the action potential was slowed down, and the height of the plateau was increased and the magnitude of contraction was increased.

1 mM 4-AP를 정상 Tyrode 용액에 첨가한 상태에서 0.1 Hz의 자극을 주었을 때, 활동전압은 정상 Tyrode 용액에서 자극빈도를 0.1 Hz로부터 2 Hz로 증가시켰을 때처럼 초기의 빠른 재분극기가 느려지면서 초기에 plateau가 형성되었고, 수축의 크기도 증가하였다 (Fig. 3). 자극빈도를 0.1 Hz에서 2 Hz로 증가시켰을 때 활동전압의 모양은 별 변화가 없었으며 (Fig. 4B), 자극이 2 Hz로 1분간 계속되는 동안에는 활동전압기간이 다소 감소함을 볼 수 있었다 (Fig. 4B). 이 때 수축은 점차로 증가하는 positive staircase를 볼 수 있었으나 정상용액에서보다 증가폭이 적었고 빨리 peak를 이루어 평형에 도달했다 (Fig. 4A). 1분간 휴식시킨 후 다시 0.1 Hz의 자극을 줄 때는 수축의 강화와 negative staircase가 나타났는데, 정상용액에서 강화되었던 수축은 처음 두세번의 수축에서 크게 감소되었던 것에 비해, 4-AP에서는 여러 수축에 걸쳐서 점진적으로 감소되었다 (Fig. 4A). 이때의 활동전압은 그 기간이 점차 증가하여 positive staircase때의 변화와 대칭되는 양상을 보였다 (Fig. 4D). 이에 수축의 크기와 활동전압 기간의 증가는 반대로 일어남을 알 수 있었다.

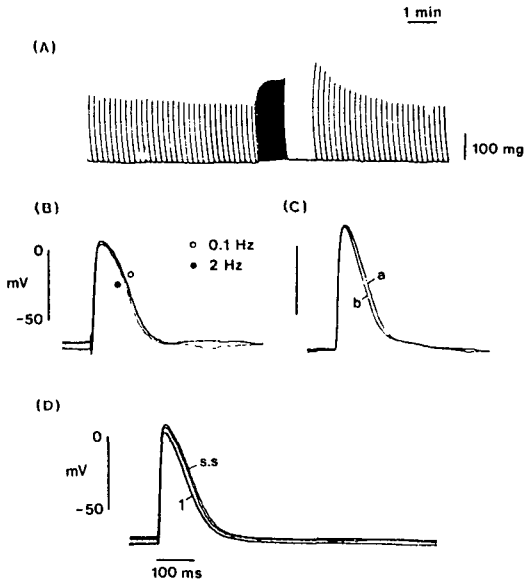


Fig. 4. Changes in the action potential and contraction in 1 mM 4-AP Tyrode solution by the stimulus frequency. A) Positive and negative staircases of contraction. The stimulation protocol was same as in fig 2A. B) Action potentials at 0.1 Hz (○) and 2 Hz (●) stimulation. C) Action potentials at 2 Hz stimulation before the steady-state. (a) is the record just after the stimulation frequency was changed from 0.1 Hz to 2 Hz and (b) is the record just before the steady-state was obtained at 2 Hz. D) Action potentials during contraction negative staircase period. 1 is the first record at 1 Hz after 1 min rest and s.s is the record at the steady-state.

2. Na 농도경사의 감소

NaCl 대신 동량의 LiCl로 대체하여 Na⁺ 농도경사를 감소시켰을때 활동전압 후반기의 plateau가 줄어들어 활동전압의 기간이 단축되며, 수축의 크기가 크게 증가하는 효과를 보였다(Fig. 5). Li⁺은 Na 통로를 거의 Na⁺처럼 통과하는 성질이 있기 때문에 Na-감소가 활동 전압의 지나치기 전압에는 거의 영향이 없으나 Na-Ca 교환기전에는 Li⁺이 Na⁺ 대신 운반될 수 없음이 알려져 있는데, 이 실험결과는 Na-Ca 교환기전이 억제되어 나타난 것임을 알 수 있다(Mitchell et al, 1984; Earm et al, 1989).

자극빈도를 2 Hz로 증가시킬때, 활동전압은 빠른

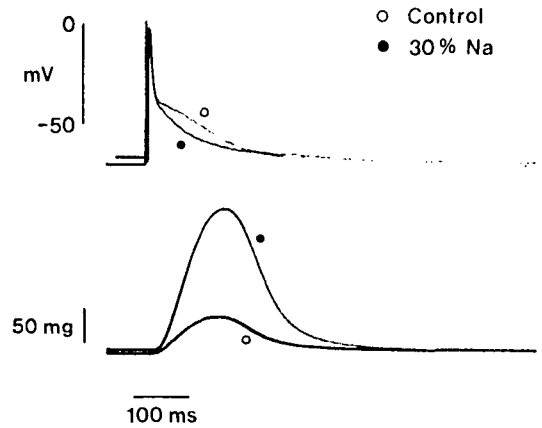


Fig. 5. Effects of reducing extracellular sodium concentration on the action potential and the contraction at 0.1 Hz stimulation. When external sodium was reduced to 30% (●) the late-plateau of the action potential was abolished, while the magnitude of contraction was increased.

재분극이 느려지며 초기에 plateau가 생겼으나 그 기간은 현저히 짧았다(Fig. 6B). 2 Hz의 자극을 1분간 계속하는 동안 수축의 크기는 급격한 증가를 보여 positive staircase가 나타나나, 정점에 이르면 후에는 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6A). 이때 활동전압의 변화는 수축의 증가시(a)보다 수축의 감소시(b)에서 활동전압기간이 짧아졌다(Fig. 6C).

1분간의 휴식 후 다시 0.1 Hz의 자극을 줄때는 수축의 강화와 negative staircase는 나타나지 않았고(Fig. 6A) 활동전압의 모양도 0.1 Hz에서의 항상상태의 것과 같았다(Fig. 6D).

3. Ca 통로 차단제의 효과

Ca 통로 차단제들은 비특이적으로 Na-Ca교환기전도 억제하는 것으로 알려져 있다(Blaustein, 1977; Coraboeuf et al, 1981). 또한 Ca 전류를 차단함으로써 세포내 Ca-유입이 억제될 것이나 세포내 저장고로부터 Ca²⁺을 유리하는데 필요한 Ca²⁺은 소량이어도 되므로(Morad, 1973) 약간의 Ca-유입으로도 세포내 Ca²⁺ 증가는 일어날 수 있을 것이다. 본 실험에서는 0.5 μM verapamil을 정상 Tyrode용액에 첨가한 후 20분 이상 지나서 관찰 하였다. 0.1 Hz의 자극빈도에서 활동전압은 전반적으로 억제되고 수

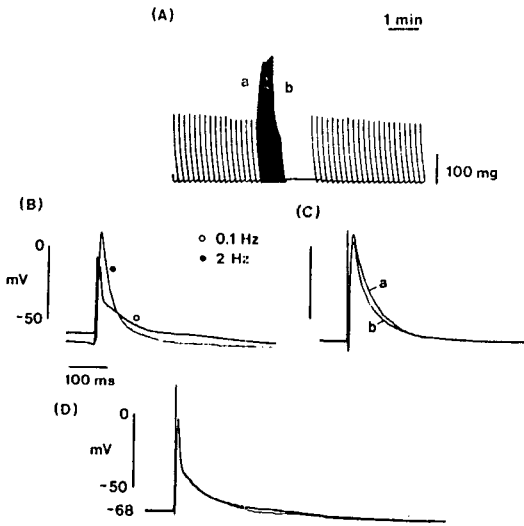


Fig. 6. Changes in the action potential and contraction in low sodium (30%) solution by the stimulus frequency. A) Contraction changes by the same stimulus protocol as in 2A and 4A. When the stimulus frequency was increased to 2 Hz, the magnitude of the contraction was initially increased, but gradually decreased. B) Action potential change with increasing stimulation frequency from 0.1 Hz to 2 Hz. C) Record (a) is taken during positive staircase period and (b) is the record during negative staircase period. D) Action potentials during post-rest stimulation. There was no remarkable changes from the first action potential and the steady-state action potential by the post-rest stimulation.

축의 크기도 아주 미약하였다(Fig. 7).

자극빈도를 2 Hz로 증가시키면 억제되어 있는 활동전압의 후반부 부분이 증가되면서 수축도 증가됨을 볼 수 있었다(Fig. 8A). 2 Hz의 자극이 계속됨에 따라 활동전압 후반부에서는 plateau가 형성되었고(Fig. 8B), 좀 더 자극이 지속됨에 따라 후반부의 plateau가 높아지는 양상을 보였다(Fig. 8B). 이때의 수축은 그 크기가 현저히 커져서 활동전압 후반부의 plateau 형성과 더불어 수축이 생겨남을 볼 수 있었다.

1분간 휴식후의 0.1 Hz 자극에서는 수축의 강화와 그에 따른 negative staircase가 나타나지 않았고, 활동전압의 모습은 0.1 Hz 항상상태의 것과 다름이 없

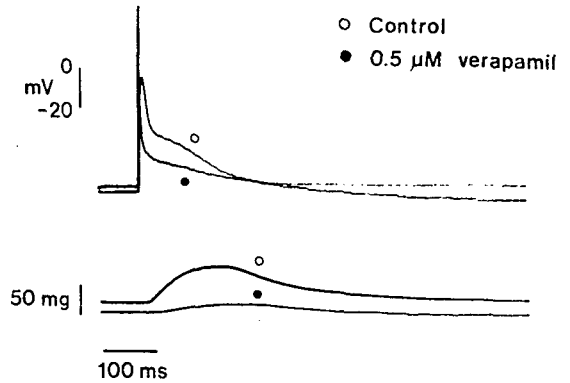


Fig. 7. Effects of Ca-channel blocker on the action potential and contraction at 0.1 Hz stimulation. The plateau of the action potential was reduced and the contraction was decreased by 0.5 μ M verapamil (●).

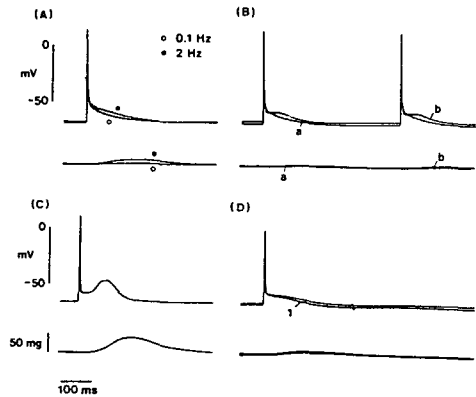


Fig. 8. action potential and contraction changes by the stimulus frequency in 0.5 μ M verapamil. A) Action potentials and contractions at 0.1 Hz (○) and 2 Hz (●). Late phase of the action potential was elevated, and the contraction was increased at 2 Hz. B) Transient changes in action potential and contraction at 2 Hz before the steady-state. Late plateau phase of the action potential was elevated and the contraction was increased. C) When the late plateau phase of the action potential was elevated at 2 Hz, the contraction was increased remarkably. D) Action potentials and contractions in post-rest stimulation of 0.1 Hz. There were no changes in action potential and contraction by the first stimulus and steady-state.

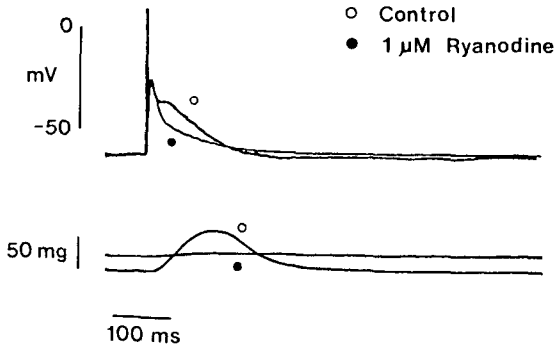


Fig. 9. Effect of ryanodine on the action potential and the contraction at 0.1 Hz stimulation. Records before (○) and after (●) treatment of 1 μM ryanodine were superimposed. The late plateau phase of action potential was depressed and the contraction was disappeared.

었다 (Fig. 8D).

4. 근장그물(SR) 기능의 억제

세포내 Ca 저장고인 근장그물로부터 Ca-유리를 억제하는 물질인 ryanodine (Chamberlain et al, 1984; Sukto & Kenyon, 1983) 1 μM을 주고 20분이상이 지난 후 그 효과를 관찰하였다. 0.1 Hz의 자극에서는 정상대조시에 뚜렷하던 활동전압 후반부의 plateau가 현저히 낮아졌고 수축은 소실되었다. 즉, ryanodine에 의하여 활동전압 후반부 plateau의 대부분이 소실됨과 함께 수축이 소실되었다 (Fig. 9)

자극빈도를 2 Hz로 증가시켰을 때는 수축이 생겨나며 자극이 계속되는 동안 그 크기가 조금씩 증가하였다 (Fig. 10A). 이때의 활동전압에서는 빠른 재분극이 느려지며 초기 plateau가 나타나 그 기간이 점차로 증가하는 positive staircase를 보였다 (Fig. 10 B).

1분간의 휴식 후 0.1 Hz 자극에서는 활동전압의 모양이 2 Hz의 자극을 주기전으로 돌아갔으며 수축도 나타나지 않았다 (Fig. 10C).

고 찰

토끼의 심방근에서 0.1 Hz의 느린 자극에 의하여 재분극기가 빠른 재분극 시기와 느린 재분극 시기로

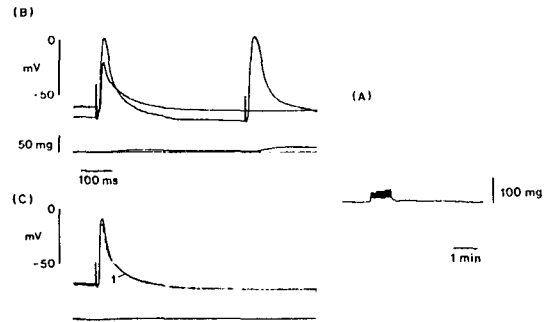


Fig. 10. Changes in the action potential and contraction by the stimulus frequency in 1 μM ryanodine. A) Contraction change by the same stimulus protocol as in 2A, 4A and 6A. Contraction was appeared in the 2 Hz stimulation. b) Transient changes in action potential and contraction by change of the stimulus frequency from 0.1 Hz to 2 Hz. The plateau of action potential was increased and the contraction was increased. C) Action potentials and contractions in post-rest stimulation. There was no change by the first stimulus and steady state.

나뉘어지는데 이것은 빠른 재분극을 일으키는 전압-의존적인 일과성 외향전류가 0.1 Hz의 자극에서는 다음 자극까지 완전히 회복되어 (Giles & Imaizumi, 1988; Boyett, 1981 a,b in sheep Purkinje fiber) 그 효과가 뚜렷하기 때문으로 보고있다. 또한 느린 재분극 시기는 활동전압의 upstroke 시작으로부터 12~20 ms 후에 -30~-40 mV에서 plateau를 보였는데, 이 후반기의 plateau는 30% Na⁺ reduction, 1 μM ryanodine의 조건에서 억제됨을 보아, 이는 Na⁺ 농도경사에 의존하고, 세포에서 유리되는 Ca²⁺에 의하여 활성화되는 내향전류인 Na-Ca 교환기전 (Noble, 1984; Hilgemann & Noble, 1987; Cannell et al, 1987)에 의한 것으로 볼 수 있다.

1. 수축과 활동전압의 모양

1 mM 4-AP를 주었을 때와 0.1 Hz에서 2 Hz로 자극빈도를 증가시켰을 때, 각각의 활동전압은 모두 빠른 재분극이 느려져서 초기에 높은 plateau를 보이며 수축의 크기는 증가하였는데 이때는 일과성 외향전류가 완전히 회복되지 않아 억제되어 재분극이

느려지므로 (Giles & Imaizumi, 1988; DiFrancesco & Noble, 1985), Ca 전류에 의한 Ca 유입이 증가하고, 높은 전압에서의 Na-Ca 교환기전의 내향성분이 감소하여 (Mullins, 1979) 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가되는 것으로 보인다.

0.1 Hz에서 Na^+ 를 Li^+ 으로 대체하여 세포의 Na^+ 를 30%로 감소시킨 용액에서는 Na-농도경사의 감소에 의해 원동력이 줄어들어 Na-Ca교환기전이 억제되므로 내향성분이 감소하여 (Mechmann & Pott, 1986) 활동전압의 후반부 plateau가 소실되고 세포내 Ca 농도가 증가하게 된다 (Hilgemann, 1986). 따라서 수축의 크기도 크게 증가한 것으로 보인다. $1 \mu M$ ryanodine에 의하여 SR의 기능이 억제되어 있는 상태에서는 (Sukto & Kenyon, 1983) Ca 유입에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가 만으로는 Na-Ca교환기전의 내향성분을 활성화시키지 못하여 (Mechmann & Pott, 1986) 후반부 plateau가 소실된 것으로 볼 수 있다. $0.5 \mu M$ verapamil 조건에서는 Ca 유입이 억제되므로 (Blaustein, 1977; Coraboeuf et al, 1981) 활동전압이 전체적으로 억제되어 보인다. 이 두 조건에서 수축이 나타나지 않는 것은 0.1 Hz 자극에 의한 세포내 Ca^{2+} 변화로는 흥분-수축 연결이 이루어지지 않기 때문인 것으로 생각된다.

2. Positive staircase

실험의 모든 조건에서 자극빈도를 0.1 Hz에서 2 Hz로 증가시키면 수축의 크기가 증가함을 볼 수 있었다.

4-AP에서는 자극빈도를 증가시켰을 때 활동전압의 모양에 거의 변화가 없는 것은 빠른 자극에서의 일과성 외향전류 차단효과가 4-AP의 작용과 같기 때문으로 보인다 (Giles & Imaizumi, 1988). 2 Hz로 자극을 계속하였을 때는 수축의 크기가 점차로 증가하는 positive staircase를 보이면서 활동전압기간이 줄어들었는데 (Wohlfart, 1979) 수축의 크기가 세포내 Ca^{2+} 농도를 반영한다면, positive staircase가 일어나는 동안 자극이 계속됨에 따라 각 수축에 관여하는 세포내 Ca^{2+} 농도가 점차로 증가되므로 활동전압 기간의 감소는 이에 따른 Ca-유입의 감소와 세포내 Ca^{2+} 농도에 의존하는 외향전류 (Bassingthwaghte, 1976)의 증가에 의한 것으로 볼 수 있다.

30% Na-감소 용액에서는 Ca-유출이 억제되어 세포내 Ca^{2+} 농도가 높아지므로 (Lee et al, 1980; Marhan et al, 1980) 수축의 크기가 커지는 것으로 보인다 (Chapman, 1983). 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 따라 Ca-유입이 억제 될 때에도 (Mitchell et al, 1933; Fabiato, 1985) positive staircase를 보이는 것은, positive staircase가 세포밖으로부터 Ca-유입의 증가에 의해 일어나는 것이 아니고, 세포내에서 유리되는 Ca^{2+} 의 증가에 의해 일어난다고 볼 수 있다 (Bers, 1985). Na-감소 시의 수축의 positive staircase는 급격히 일어나고 정점에 도달한 후에 수축의 크기가 점차 감소하는 것을 볼 수 있었는데, 이 때의 활동전압 기간도 줄어드는 것으로 보아 이는 세포내 Ca^{2+} 이 증가된 상태에서 SR에서의 유리가 억제되기 때문으로 생각된다 (Fabiato, 1985). Na-감소 조건에서 positive staircase가 Ca-유입량의 증가 없이 (Hilgemann, 1986) 일어나는 것은 SR에 저장되어 있는 Ca^{2+} 이 빠른 자극에 의하여 유리장소 (release site)로 이동되어 (Bers, 1985; Wussling & Szymanski, 1972) 유리되는 Ca^{2+} 양이 많아지는 것으로 설명할 수 있다.

Verapamil 조건에서 2 Hz로 자극빈도를 증가시켰을 때 활동전압의 후반부 plateau가 점차로 형성되며 후반부 plateau의 증가와 함께 수축의 크기도 증가되었는데, 후반부의 plateau는 SR의 Ca-유리에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가를 반영할 수 있으므로 (Hilgemann, 1986) Ca-유입과 Na-Ca교환기전이 억제된 상태에서 SR의 Ca-유리에 의한 세포내 Ca 농도가 증가함 (Hilgemann, 1986)은, Na-감소 때와 같이 SR 저장고의 Ca^{2+} 이 빠른 자극에 의해 유리장소로 이동되어 유리되는 Ca^{2+} 의 양이 많아지는 것으로 설명될 수 있다.

$1 \mu M$ ryanodine에 의하여 SR이 억제된 상태에서 2 Hz로 자극빈도를 증가시켰을 때는 활동전압의 초기 부분이 증가함에 따라 수축이 나타났는데, 이로부터 세포내 Ca^{2+} 증가가 있음을 알 수 있으며, 이때의 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 Ca-유입의 증가로부터 온 것으로 생각된다.

이상의 사실들로부터 positive staircase 현상은 Ca-유입의 억제된 상태에서도 나타나는데 이는 SR의 유리장소에 Ca^{2+} 이 증가하여 Ca-유리가 많아지기

때문에 일어나는 것으로 볼 수 있으며, Ca-유입이 억제되지 않는 상태에서는 빠른 자극에 의한 Ca-유입의 증가도 관여하리라고 생각된다.

3. 수축의 강화현상

각 실험의 모든 경우에서 자극빈도 증가시 positive staircase가 일어났으나 1분간 휴식 후에 수축의 강화는 정상 Tyrode 용액에서와 4-AP의 조건에서만 나타났다. Ca-유입이 억제되어 있는 Na-감소시와 verapamil 조건에서는 휴식 후 수축의 크기가 positive staircase가 나타나기 전 원래의 크기와 같았는데, 이는 빠른 자극에 의해 증가되었던 SR 유리장소의 Ca²⁺ 양이 원래의 양으로 되돌아 갔음을 생각할 수 있다(Bers, 1985; Fabiato 1985). 그렇다면 수축의 강화는 빠른 자극시 세포외로 부터 유입된 Ca²⁺이 SR의 유리장소에 축적되었다가 한꺼번에 유리되어 일어난다고 볼 수 있다. 이는 실제로 세포의 Ca²⁺ transient의 측정 결과에 의하여 빠른 자극시에 정상 Tyrode 용액과 4-AP의 조건에서 세포의 Ca²⁺이 소모되었고, 휴식 후 강화수축시에는 세포의 Ca²⁺이 증가되었다는 보고와 잘 부합된다(Hilgemann, 1986).

Ryanodine의 경우에는 빠른 자극에 의하여 positive staircase가 나타났으며 휴식 후 수축의 강화가 없었는데, 이는 빠른 자극시에는 Ca 유입의 증가에 의한 세포내 Ca²⁺농도의 증가가 일어났으나 자극의 휴식기 동안 증가된 세포내 Ca²⁺이 세포 밖으로 유출된 것으로 보인다(Hilgemann, 1986).

4. Negative staircase

수축의 negative staircase는 강화현상이 있는 정상 Tyrode 용액에서와 4-AP의 조건에서만 나타났다. 정상 Tyrode 용액의 조건에서 수축의 negative staircase는 활동전압 후반부-plateau의 negative staircase와 같이 나타났는데, 이는 negative staircase 현상이 활동전압 후반부의 plateau에 관여하는 Na-Ca 교환기전의 활동과 관련이 있음을 시사한다(Hilgemann, 1986).

정상 Tyrode-용액에서 수축의 negative staircase는 경사가 급하게 일어나 처음 두세번의 수축에서 대부분의 수축의 감소가 일어났다. 휴식 후 첫번째 자극

에 의하여 일어나는 수축의 크기가 가장 크고, 그때의 활동전압에서는 빠른 재분극에 뒤따라 저분극이 나타났는데, 다음 번 수축에서는 크기가 감소하고 활동전압에서의 후반부-plateau도 작아졌다. 수축의 크기가 세포내 Ca²⁺농도를 반영한다고 볼 때, 첫번째 수축시 세포내 Ca²⁺ 농도증가가 가장 커서 그에 의해 활성화되는 Na-Ca교환기전에 의한 내향성분이 크게 증가하여 활동전압 후반부의 저분극이 형성되고 세포외로의 Ca-배출도 급증하여(Hilgemann, 1986; Hilgemann & Noble, 1987) 세포내 저장고로 회수될 수 있는 양이 감소하게 될 것으로 생각되며 따라서 다음 자극에서는 SR 유리에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도의 증가가 첫번째의 자극에서보다 작아져서 수축의 크기가 감소하고, Na-Ca교환기전의 내향성분도 감소하여 활동전압의 후반부-plateau도 낮아지게 되는 것으로 보인다. 이때 Na-Ca교환기전의 활동정도는 세포내 저장고로 회수되는 Ca²⁺양에 영향을 미쳐 다음 자극에 의한 수축의 크기에 영향을 미치므로 negative staircase가 나타나게 되는 것으로 생각된다. 실제로 세포의 Ca²⁺ 농도를 측정 한 실험결과를 보면 휴식 후 첫번째 자극에서 세포외에서의 Ca²⁺ 농도 증가가 가장 컸으며 자극이 계속됨에 따라 점차로 감소하였다(Hilgemann, 1986; Hilgemann & Noble, 1987).

정상 Tyrode 용액에서는 negative staircase가 급히 일어나 처음 두세번의 수축에서 대부분의 수축의 감소가 일어났는데, 4-AP의 조건에서는 수축의 감소가 여러차례의 수축에 걸쳐 비교적 고르게 나타났다. 이는 일과성 외향전류에 의한 빠른 재분극이 억제되어(Giles & Imaizumi, 1988) 활동전압이 높은 전압부위에서 오래 머물기 때문에 상대적으로 Na-Ca교환기전의 내향성분이 감소하여 축적되었던 Ca²⁺의 배출이 비교적 느리게 이루어 지기 때문으로 생각된다(Mullins, 1979; Hilgemann, 1986).

즉 negative staircase는 SR에서 유리되는 Ca²⁺ 증가에 의해 활성화되는 Na-Ca 교환기전의 내향성분에 의해 세포내 Ca²⁺가 세포밖으로 유출되어 다음 번 수축에 기여하는 Ca²⁺ 농도가 감소하여 일어난다고 볼 수 있다.

결 론

본 연구에서는 활동전압의 모양과 수축의 크기가 밀접한 관계를 보이는 토끼의 심방근을 이용하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 결정짓는 인자들-즉, Ca 전류를 통한 Ca^{2+} 유입, SR에서의 Ca^{2+} 유리, Na-Ca교환에 의한 Ca^{2+} 배출 등-에 영향을 미치는 4-AP, verapamil, ryanodine을 첨가하거나 세포외 Na^+ 을 30% (Li로 대체) 감소시킨 조건에서 자극빈도에 따른 수축과 활동전압의 staircase 현상을 비교 분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 자극 빈도를 0.1 Hz에서 2Hz로 증가시켰을때 나타나는 수축의 positive staircase는 정상대조군 및 4-AP, verapamil, ryanodine, Na-감소의 모든 경우에 일어났으며, 동시에 활동전압의 plateau가 증가되었다.

2) 정상 Tyrode 및 4-AP 처리군에서는 2 Hz에서 1분 자극하고 1분 휴식한 다음 0.1 Hz로 되돌아왔을 때 초기수축이 항정상상태의 수축보다 증가하였다(휴식후 수축강화). 그러나 verapamil, ryanodine 및 Na-감소의 경우에는 수축강화현상이 나타나지 않았다.

3) 0.1 Hz로 되돌아왔을때 정상및 4-AP 처리군에서 negative staircase가 나타났으며 활동전압 plateau의 감소가 동반되었다. 그러나 4-AP의 경우 그 정도가 정상군에 비하여 현저하지 않았다.

이상의 결과로부터 수축 및 활동전압의 staircase 현상은 세포막을 통한 Ca-전류 및 근장그물에서의 Ca^{2+} 유리에 따라 영향을 받는 것으로 결론지을 수 있었다.

REFERENCES

Bassingthwaghte JB, Fry CH & McGuigan JAS (1976). Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle; a mechanism for the control of action potential duration? *J Physiol* 262, 15-37

Beeler GW & Reuter H (1970). The relation between membrane potential, membrane currents and acti-

vation of contraction in ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 207, 211-229

Bers DM (1985). Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in the cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am J Physiol* 248, H366-H381

Blaustein MP (1977). Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcim exchange in squid axons. *Biophys J* 20, 79-111

Blinks JR & Koch-Weser J (1961). Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 134, 373-389

Boyett MR (1978). An analysis of the effect of the rate of stimulation and adrenaline on the duration of the cardiac action potential. *Pflügers Arch* 377, 155-166

Boyett MR & Jewell B (1978). A study of the factors responsible for rate-dependent shortening of the action potential in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 285, 359-380

Boyett MR (1981a). A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in sheep Purkinje fibers. *J Physiol* 319, 1-22

Boyett MR (1981b). Effects of rate-dependent change in the transient outward current on the action potential in sheep Purkinje fibers. *J Physiol* 319, 23-41

Carmeliet E (1977). Repolarization and frequency in cardiac cells. *J Physiol Paris* 73, 903-923

Cannell MB, Berlin JR & Lederer WJ (1987). Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* 238, 1419-1423

Chamberlain BK, Volpe P & Fleischer S (1984). Calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles: general characteristics. *J Bio Chem* 259, 7540-7546

Chapmann RA (1983). Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 245, H535-H552

Coraboeuf E, Gantier P & Guiraudou P (1981). Potential and tension changes induced by sodium removal in dog Purkinje fibres: Role of an electrogenic Na-Ca exchange. *J Physiol* 311, 605-622

DiFrancesco D & Noble D (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philosophical Trans Royal Soc B* 307, 353-398

- Earm YE, Ho WK & So IS (1987). An inward current activated during late low-level plateau phase of the action potential in rabbit atrial cells. *J Physiol* 410, 64P
- Fabiato A (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245, C1-C14
- Fabiato A (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 247-289
- Fozzard H (1977). Heart: excitation-contraction coupling. *A Rev Physiol* 39, 201-220
- Gibbons W & Fozzard H (1975). Slow inward current and contraction of sheep Purkinje fibres. *J Gen Physiol* 65, 367-384
- Giles WR & Imaizumi Y (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 405, 123-145
- Hilgemann DW & Langer GA (1984). Transsarcolemmal calcium movements in arterially perfused rabbit right ventricle measured with extracellular calcium-sensitive dye. *Circ Res* 54, 461-467
- Hilgemann DW (1986a). Extracellular calcium transients and action potential configuration changes related to post-stimulatory potentiation in rabbit atrium. *J Gen Physiol* 87, 675-706
- Hilgemann DW (1986b). Extracellular calcium transients at single excitations in rabbit atrium measured with tetramethylmurexide. *J Gen Physiol* 87, 707-735
- Hilgemann DW & Noble D (1987). Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transients in rabbit atrium: reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc R Soc Lond B* 230, 163-205
- Lee CO, Uhm DY & Dresdner K (1980). Sodium-calcium exchange in the rabbit heart muscle cells: direct measurement of sarcoplasmic Ca activity. *Science* 699, 701
- Marhan E, Rind TJ, Tsien RW & Tsien RY (1980). Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca sensitive microelectrodes. *Nature* 845-850
- Mechmann S & Pott L (1986). Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 319, 587-599
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA & Twist VW (1983). Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc Roy Soc B* 219, 447-469
- Mullins L (1979). The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am J Physiol* 236, C103-110
- Morad M & Goldmann Y (1973). Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development tension. *Proc Biophys Molec Biol* 27, 257-313
- Noble D (1984). The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 353, 1-50.
- Noble D (1984). Sodium-calcium exchange and its role in generating electric current. In: *Nathan R (ed) Cardiac Muscle: the regulation of Excitation and Contraction*. Academic Press, New York, p171-200
- Noble S & Shimoni Y (1981). The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium. *J Physiol* 310, 57-75
- Ochi R & Trautwein W (1971). The dependence of cardiac contraction on depolarization and slow inward current. *Pflügers Arch* 323, 187-203
- Reuter H (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentration. *J Physiol* 192, 479-492
- Reuter H (1973). Time- and voltage-dependent contractile responses in mammalian cardiac muscle. *Eur J Cardiol* 1, 177-181
- Rosin H & Farah A (1955). Post-stimulatory potentiation of contractility in the isolated auricle of rabbit. *Am J Physiol* 181, 75-82
- Sutko JL & Kenyon JL (1983). Ryanodine modification of cardiac muscle responses to potassium-free solution. Evidence for inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium release. *J Gen Physiol* 82, 385-404
- Tanaka I, Tosaka T, Saito H, Shin-Mura H & Saito T (1967). Changes in the configuration of the rabbit atrial action potential after various periods of rest. *Jap J Physiol* 17, 487-504
- Trautwein W (1973). The slow inward current in mammalian myocardium. *Eur J Cardiol* 1, 169-175
- Wohlfart B (1979). Relationships between peak force,

- action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. *Acta Physiol Scand* 106, 395-409
- Wood EH, Heppner RL & Weidman S (1969). Inotropic effects of electric currents. *Circ Res* 24, 409-445
- Woodworth RS (1902). Maximal contraction "staircase" contraction, refractory period, and compensatory pause of the heart. *Am J Physiol* 8, 213-240
- Wussling M & Szymanski G (1972). A two-Ca-store model for potentiation phenomena on rabbit papillary muscle. *Studia Biophys* (Berlin). 34, 121-130