

토끼 단일 심실근 세포에서 Cyclic GMP의 Ca²⁺ 전류 조절기전에 관한 연구

안 재 호* · 서 경 필** · 엄 용 의***

— Abstract —

Modulation of Calcium Current by Cyclic GMP in the Single Ventricular Myocytes of the Rabbit

Jae Ho Ahnn, M.D., Kyung Phill Suh, M.D., Yung E Earm, M.D.

In order to investigate the effect of intracellular cyclic GMP on the calcium channel, whole cell patch clamp technique with internal perfusion method was used in the single ventricular myocytes of the rabbit. Cyclic GMP, cGMP analogues, cAMP, isoprenaline and forskolin were perfused into cells and their effects on the calcium current were analysed by applying depolarizing step pulse of 10 mV in amplitude for 200 msec from holding potential of -40 mV. Calcium currents usually activated from -30 mV and then reached a peak at +10 mV. Amplitude of the calcium current was standardized with membrane capacitance, 50 pF. Peak amplitude at +10 mV in control was -0.15 nA/50pF. When 100 μ M cAMP was applied from the pipette, peak amplitude of calcium current increased to -0.32 nA and addition of 1 μ M isoprenaline further increased its amplitude. In the presence of cGMP it alone also produced an increase of the calcium current to -0.52 nA/50pF and addition of isoprenaline or forskolin increased its magnitude to - (0.55-0.95) nA/50pF. Simultaneous application of cGMP and cAMP increased the calcium current to -0.67 nA/50 pF. Among the cGMP analogues, 8-Br-cGMP was the most potent stimulant for the calcium current activation.

From the above results it could be concluded that cGMP increases the calcium current not through cAMP dependent protein kinase nor cAMP dependent phosphodiesterase pathway, but through independent phosphorylation pathway, possibly cGMP dependent protein kinase pathway.

Key Words: Ventricular myocytes, Whole cell patch clamp, Calcium current, Cyclic GMP analogues, cAMP, Isoprenaline

*충북대학교 의과대학 흉부외과학교실

*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chungbuk National University Hospital

**서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

**Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

***서울대학교 의과대학 생리학교실

***Department of Pysiology, College of Medicine, Seoul National University

1. 서 론

세포막에 존재하는 여러가지 이온 통로들은 세포의 환경의 변화에 대한 정보를 세포내로 전달하고 적절한 반응을 일으키게 한다^{20,21}. 이러한 이온 통로들은 주로 세포막 전압의 변화나 화학물질에 의해서 투과성이 변화하게 되며, 다른 여러가지 기전에 의하여 투과성이 조절된다.

Ca^{2+} 통로는 근육 수축, 호르몬과 신경전달물질(neurotransmitter)의 분비, Ca^{2+} 의존적인 단백질에 의해 조절되는 대사과정 등의 많은 중요한 세포기능에 관여하고 있으며, 특히 심장에서는 심근 수축력 및 심박수의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다^{19,20,25}.

생체에서는 이렇게 중요한 역할을 담당하고 있는 Ca^{2+} 통로에 대한 조절기구들이 잘 발달되어 있으며, catecholamine이나 acetylcholine 등의 여러가지 신경전달물질이나 호르몬 등이 그 대표적인 예이다^{2,15,20}. 또한 임상에서도 Ca^{2+} 전류의 조절목적으로 여러가지 약물들이 널리 사용되고 있다.

교감신경을 통한 심근수축촉진 작용은 막전압의 존성 Ca^{2+} 전류의 증가에 의하여 주로 일어난다. Ca^{2+} 전류의 증가는 대부분 β -수용체를 통한 cyclic AMP 의존성 protein kinase가 Ca^{2+} 통로를 인산화함으로써 일어나는 것으로 알려져 있다^{11,26}.

그러나 β -agonist에 의한 Ca^{2+} 전류의 증가는 cAMP 의존성 인산화 기전으로서 만은 완전한 설명이 안되고 GTP 결합 단백질(G-단백)을 비롯한 또다른 기전들이 고려되고 있다^{14,17,23,31,32}. 그러나 개구리, 쥐, 기니피 심실근 세포에서 isoprenaline에 의한 Ca^{2+} 전류의 증가는 cAMP 의존성 인산화 과정 억제에 의하여 완전 소실되는 결과로부터 β -agonist에 의한 Ca^{2+} 전류 증가는 순전히 cAMP 의존성 인산화 과정에 의한다는 상반된 보고¹³도 있어 그 기전이 분명하지 않다.

또 같은 cyclic nucleotide 이며 생체내에 존재하고 있는 cGMP에 대해서는 그 역할조차 분명하게 밝혀져 있지 않으며, 작용기전에 대해서도 많은 논란이 있다. 그러나 acetylcholine, adenosine, ANP 등의 호르몬이나 여러가지 약물들에 의해서 세포내 cGMP의 농도가 변화하기 때문에, cGMP가 세포내 이차전령으로서 어떤 역할을 담당하리라는 것은 쉽게 추측

할 수 있다.

최근에는 심근에 cGMP 및 유도체를 직접 투여하면 수축력의 감소, 활동 전압 길이의 단축 및 slow action potential의 소실 등이 나타난다는 연구결과들이 발표됨에 따라^{1,27}, cGMP가 Ca^{2+} 전류에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. frog ventricle 및 guinea-pig ventricle을 사용한 실험에서 cGMP는 cAMP 존재하에서 Ca^{2+} 전류의 크기를 감소시키며, chick embryo에서는 cAMP가 존재하지 않더라도 cGMP가 Ca^{2+} 전류의 크기를 감소시킨다는 실험결과가 발표되었다^{6,12,16,29}.

또한 cGMP의 작용기전에 대해서도 frog ventricle에서는 gGMP가 cGMP-activated phosphodiesterase(PDE)를 촉진하여 작용을 나타내고^{6,12}, guinea-pig 및 chick embryo에서는 cGMP-dependent protein kinase(PK)를 촉진하여 작용을 나타낸다고 주장했다^{16,29}. 최근의 이러한 실험결과들은 cGMP의 작용기전이 한가지가 아니라 동물의 종이나 조직마다 틀릴 수 있다는 것을 보여준다고 할 수 있을 것이다.

그러나 이러한 실험들이 모두 실온에서 행해졌기 때문에 과연 포유류의 체온인 37°C에서도 같은 결과를 얻을 수 있을지는 의문의 여지가 있다. 연구자는 토끼의 단일 심방근 세포를 사용해서 37°C에서 cGMP의 작용기전에 대한 예비실험을 시행한 결과, cAMP가 존재할 때는 cGMP에 의해서 Ca^{2+} 전류의 크기가 오히려 증가된다는 사실을 발견하였다³. 이러한 결과는 cGMP의 효과가 다른 조직들과는 다른 경로를 통해서 일어날 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 토끼의 단일 심실근 세포를 사용하여 예비실험에서 관찰한 Ca^{2+} 전류에 대한 cGMP의 효과를 다시 확인하고, 여러가지 cGMP 유도체들을 사용하여 cGMP의 작용기전을 밝혀보고자 하였다.

2. 연구목적

토끼 단일 심실근 세포에서 Ca^{2+} 전류를 whole cell patch clamp 방법으로 기록하고 cGMP의 효과를 실온 및 37°C에서 관찰한다. 전극내 cAMP 존재에 따라서 cGMP의 효과가 달라지는 것을 확인하고 cGMP-stimulated phosphodiesterase(PDE)나 Ca^{2+} 통로를 인산화하는 protein kinase(PK)에 대한 촉진 혹은 억제작용이 없는 dibutyryl cGMP와, cGMP-stimulated PDE에 대한 효과는 거의 없지만 PK에

대한 촉진 작용은 cGMP보다 더 큰 8-bromo-cGMP, β -agonist인 isoprenaline 그리고 adenylate cyclase activator로 알려진 forskolin을 사용하여 cGMP의 세포내 Ca^{2+} 통로 조절기전을 밝혀보고자 하였다.

3. 연구 재료 및 방법

1) 토끼의 단일 심실근 세포의 분리

토끼의 단일 심실근 세포의 분리 방법은 Earm et al.(1990)의 방법³⁾을 이용하여 분리하였다. 1kg 이내의 토끼를 마취시켜서 심장을 꺼낸 후, Langendorff apparatus에서 collagenase가 포함된 Ca^{2+} free Tyrode 용액으로 15분~20분 정도 perfusion을 시행하였다. 심실 부분을 떼내어서 잘 흔든 다음에 떨어져 나온 세포들은 low Cl, high K 용액에 넣어서 4°C에서 보관하였고, inverted microscope로 옮겨서 37°C에서 실험하였다. 실온에서는 실험은 20°C 내외에서 시행하였다.

2) 실험 용액들의 조성

실험에 사용한 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 143mM, KCl 5.4 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, glucose 5 mM, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethanesulfonic acid) 5 mM이며, pH는 HaOH로 적정하여 7.4로 맞추어 사용하였다. 모든 경우에 막전압 의존적인 일과성 외향전류(transient outward current)를 억제하기 위하여 Tyrode 용액에 1 mM의 4-aminopyridine을 첨가하여 사용하였다.

전극내 용액(internal solution)은 K^+ 전류를 억제하기 위해서 Cs-aspartate 110 mM, Mg-ATP 5 mM, di-Tris creatine phosphate 2.5 mM, disodium creatine phosphate 2.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 5 mM, TEA-CL (tetraethylammonium chloride) 20 mM, EGTA (ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetra-acetic acid) 5 mM의 조성을 가진 것을 사용하였으며, pH는 CsOH로 적정하여 7.4로 맞추었다. 단, 막전류 고정법을 사용하여 활동전압을 기록할 경우에는 K-aspartate 110 mM, Mg-ATP 5 mM, di-Tris creatine phosphate 5 mM, KCl 20 mM, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 5 mM의 조성을 가진 것을 사용하였고, pH는 KOH로 적정하여 7.4로 맞추었다.

3) 단일세포 막전압 고정법

막전압 고정법(voltage clamp)은 Hamill et al. (1981)과 유사한 방법을 사용하였으며¹⁰⁾, intracellular perfusion은 Soejima & Noma(1984) 및 Sato et al.(1985)의 방법을 사용하였다^{22,24)}.

유리전극(glass microelectrode)은 저항이 2~3 M Ω 인 것을 사용하였다. 유리전극을 세포막에 접근시키고 -10~-20 cm H $_2$ O의 음압을 가하여 giga seal을 만들었다. giga seal이 형성된 후에는 음압을 더욱 높여서 세포막을 rupture 시키고, patch clamp 증폭기를 사용하여 막전압고정법을 시행하였다.

patch clamp 증폭기를 통해서 나온 신호는 digital oscilloscope와 생기기록기를 통해서 관찰하였고 동시에 PCM (pulse code modulator) 기록장치를 통해서 VTR (video tape recorder)에 저장하며, XY 플러터에 재생하여 분석하였다.

4) 실험성적의 처리

본 연구는 실험성적의 분석이 실험조건 간의 정성적 비교가 주된 목적이기 때문에 통계학적인 처리는 하지 않았다. 그러나 모든 경우 막전류의 크기를 세포막 넓이(세포막 capacitance 50pF)으로 표준화하여 비교하였고 5회 이상 동일한 경향을 보일 경우만을 유의있는 변화로서 간주하였다. 그리고 실험성적으로 예시한 그림은 그 중에서 가장 대표적인 것을 선택하여 제시하였다.

4. 연구성적

1) 토끼 심실근에서의 Ca^{2+} 전류

단일 심실근에서 Ca^{2+} 전류를 기록하기 위하여 유지전압 -40mV에서 10mV 간격으로 -30mV로 부터 +50mV까지 저분극 pulse를 200 msec 동안 매 5초마다 한번씩 가하였다. 이 유지 전압에서는 Na^+ 전류가 완전 비활성화되어 Ca^{2+} 전류에 섞여서 기록되지는 않았다. -30mV에서 부터 Ca^{2+} 전류가 기록되기 시작하였으며 저분극 pulse의 크기가 증가할수록 내향전류의 크기가 커졌으며 +10mV 근처에서 최고값을 보였다. 세포의 크기가 달랐기 때문에 세포막 넓이, 여기서는 세포막 membrane capacitance, 50pF로 표준화하여 표시하였다. 정상 대조군에서 Ca^{2+} 전류

의 크기는 +10mV에서 0.15nA/50pF의 크기를 보였다. 그림 1의 윗부분에 Ca²⁺ 전류의 활성화되는 정도를 두 군으로 나누어 도시하였고 아랫부분에 각 막전압에서의 전류크기를 plot하였다(전류-전압 곡선, I-V curve). +10mV에서 최고 값을 보이고 점차 다시 감소하는 양상을 나타냈고 약 +60mV 근처에서 역전되는 종(bell) 모양의 곡선을 그렸다.

2) cAMP 및 cGMP analogue들이 Ca²⁺ 전류에 미치는 영향

세포내로 100 μM의 cAMP를 투여하면 그림 1의 윗그림처럼 Ca²⁺ 전류의 크기가 정상 대조군에 비하여 증가하였다. Ca²⁺ 전류의 최고값은 대조군과 마찬가지로 +10mV에서 나타났고, 그 크기는 0.

32nA/50pF였다. 그리고 시간이 지나면서 전류 크기가 감소하는 run down 현상이 더욱 현저하였다. 그림 2의 아래에는 그림 1에서와 같이 I-V curve를 plot하여 대조군과 비교하였다. 모든 막전압 범위에서 cAMP는 Ca²⁺ 전류를 크게 하였고 경우에 따라서는 본 그림에 보이듯이 +60mV 근처에서 역전이 이루어지지 않는 경향을 보였다. 그러나 이 경향이 항상 나타나는 것은 아니었기 때문에 의의있는 결과로 취급하지는 않았다.

세포내로 100 μM의 cGMP를 투여하면 cAMP와 마찬가지로 Ca²⁺ 전류의 크기가 증가하였다. 그림 3의 윗 그림에 그 결과를 보였다. 최고값을 보이는 막전압은 대조군이나 cAMP 군에서와 같이 +10mV 근처였고 전류의 크기는 0.52nA/ 50pF로서 대조군

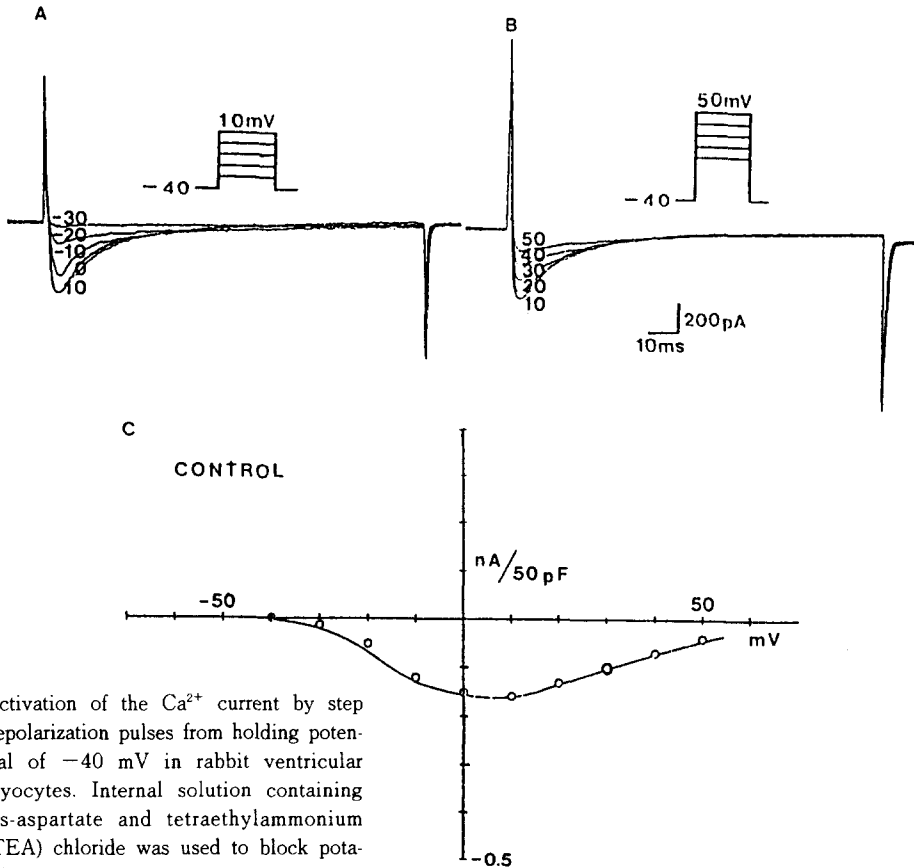


Fig. 1. Activation of the Ca²⁺ current by step depolarization pulses from holding potential of -40 mV in rabbit ventricular myocytes. Internal solution containing Cs-aspartate and tetraethylammonium (TEA) chloride was used to block potassium currents.

In A, the current records at the step pulses of -30 to +10 mV for 200 msec and in B, the current records at +10 to +50 mV were superimposed. In C, current-voltage relation (I-V curve) was plotted and shows that the peak activation of the calcium current was activated at +10 mV and its magnitude was 0.15 nA/ 50 pF. The I-V curve shows typical bell-shaped pattern.

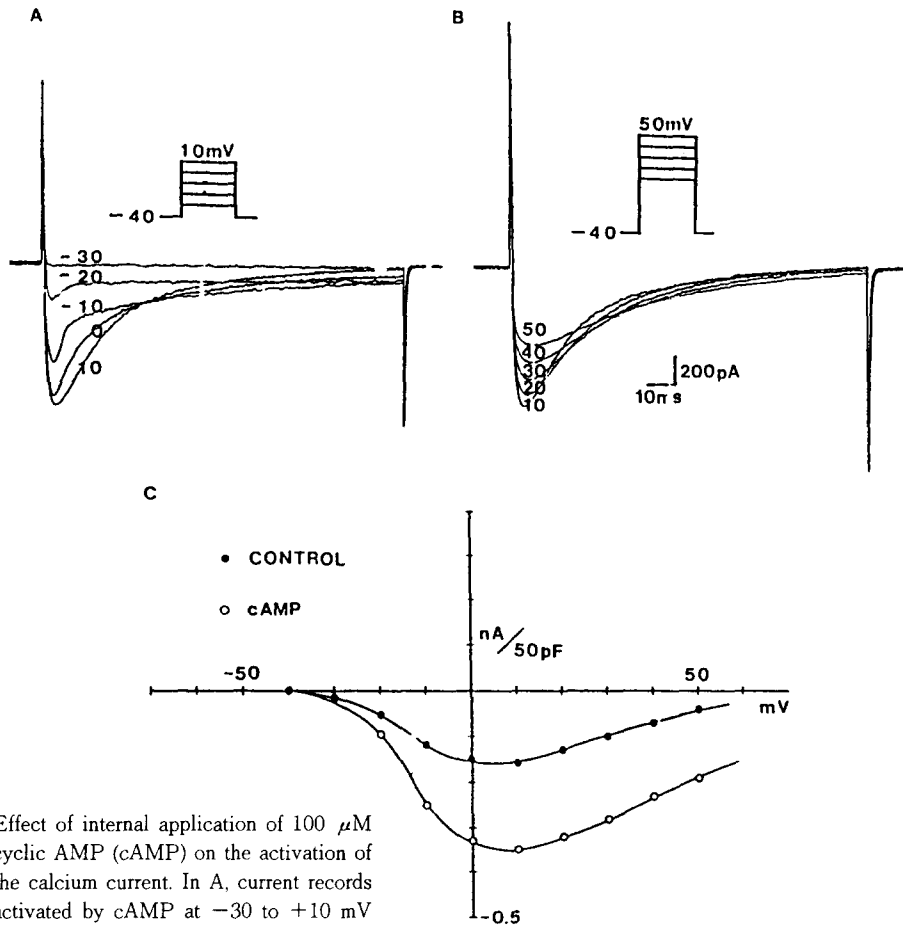


Fig. 2. Effect of internal application of $100 \mu\text{M}$ cyclic AMP (cAMP) on the activation of the calcium current. In A, current records activated by cAMP at -30 to $+10$ mV and in B, at $+10$ to $+50$ mV were superimposed.

In C, I-V curves in control (filled circle) and in the presence of $100 \mu\text{M}$ cAMP (open circle) were plotted. The peak current level was activated at $+10$ mV in both cases and their magnitude increased from $0.15 \text{ nA}/50\text{pF}$ to $0.32 \text{ nA}/50\text{pF}$ by cAMP.

에 비하여서 현저하게 증가되었고 cAMP에 의한 증가보다도 월등 크게 증가하였다. 이 결과는 Hartzell (1988)과 Hartzell et al.(1991) 등의 실험 결과와는 상반된 것이다^{11,13)}. 그림 3의 아래에 I-V curve를 plot 하였는데 cAMP와 마찬가지로 전 막전압 범위에서 Ca^{2+} 전류의 크기를 증가시켰다. 이 경우 전류의 크기는 증가하였으나 전체적인 I-V curve의 모양이나 역전 전압에는 거의 변화가 없었다.

다음에는 cGMP analogue로서 cGMP 의존성 protein kinase를 활성화 시키는 작용이 cGMP에 비하여 큰 8-bromo-cGMP를 $100 \mu\text{M}$ 투여하여 보았다. 그림 4이 윗 그림에 각 막전압에서 Ca^{2+} 전류가 활성화되는 기록을 보였고 아래에 I-V curve를 plot하였다. 모

든 막전압 범위에서 Ca^{2+} 전류의 크기가 증가되었고 $+10\text{mV}$ 에서의 최고값은 약 $0.63\text{nA}/50\text{pF}$ 였다. 이런 결과로 보아 cGMP의 작용은 cGMP 의존성 protein kinase를 통한 Ca^{2+} 통로 인산화 과정에 의한 가능성을 시사한다.

그림 5에 cGMP 의존성 protein kinase나 phosphodiesterase를 통하는 경로에는 거의 작용성이 없는 것으로 알려진 dibutyryl cGMP를 $100 \mu\text{M}$ 투여하여 보았다. 마찬가지로 전 막전압 범위에서 전류의 크기를 증가시켰다. 그림 5의 위에는 각 막전압에서의 Ca^{2+} 전류 활성화를, 아랫 그림에는 I-V curve를 plot 하였는데 $+10\text{mV}$ 에서의 최고값은 약 $0.45\text{nA}/50\text{pF}$ 였다. 이 경우 Ca^{2+} 전류의 비활성화가 매우 빨랐는

데 dibutyryl cGMP의 경우에 국한된 특징적 소견은 아니고 세포에 따라 정도의 차이가 있었다.

3) cAMP와 cGMP analogue의 협동 작용

세포내로 $100 \mu\text{M}$ 의 cAMP와 cGMP analogue를 투여하여 세포내 이차전령인 두 물질 사이의 상호 작용을 보고자 하였다. Goldberg et al.(1975)와 Goldberg and Haddock는 cAMP와 cGMP가 서로 길항 작용을 나타내기 때문에 음양설을 주장하였고^{7,8)}, Fischmeister and Hartzell(1987)은 심근 Ca^{2+} 전류 활성화에도 cGMP는 cAMP에 의하여 증가된 부분을 감소시킨다는 보고가 있었으며 cGMP 단독으로는 전혀 효과가 없다고 하였다⁶⁾. 그러나 그림 3,4,5에서 보였듯이 gGMP 단독으로 Ca^{2+} 전류를 증가시켰기 때문에 그 상호 작용을 보는 것이 중요할 것으로 생각하였다. 먼저 cAMP와 cGMP는 같이 존재할 때

용을 나타내기 때문에 음양설을 주장하였고^{7,8)}, Fischmeister and Hartzell(1987)은 심근 Ca^{2+} 전류 활성화에도 cGMP는 cAMP에 의하여 증가된 부분을 감소시킨다는 보고가 있었으며 cGMP 단독으로는 전혀 효과가 없다고 하였다⁶⁾. 그러나 그림 3,4,5에서 보였듯이 gGMP 단독으로 Ca^{2+} 전류를 증가시켰기 때문에 그 상호 작용을 보는 것이 중요할 것으로 생각하였다. 먼저 cAMP와 cGMP는 같이 존재할 때

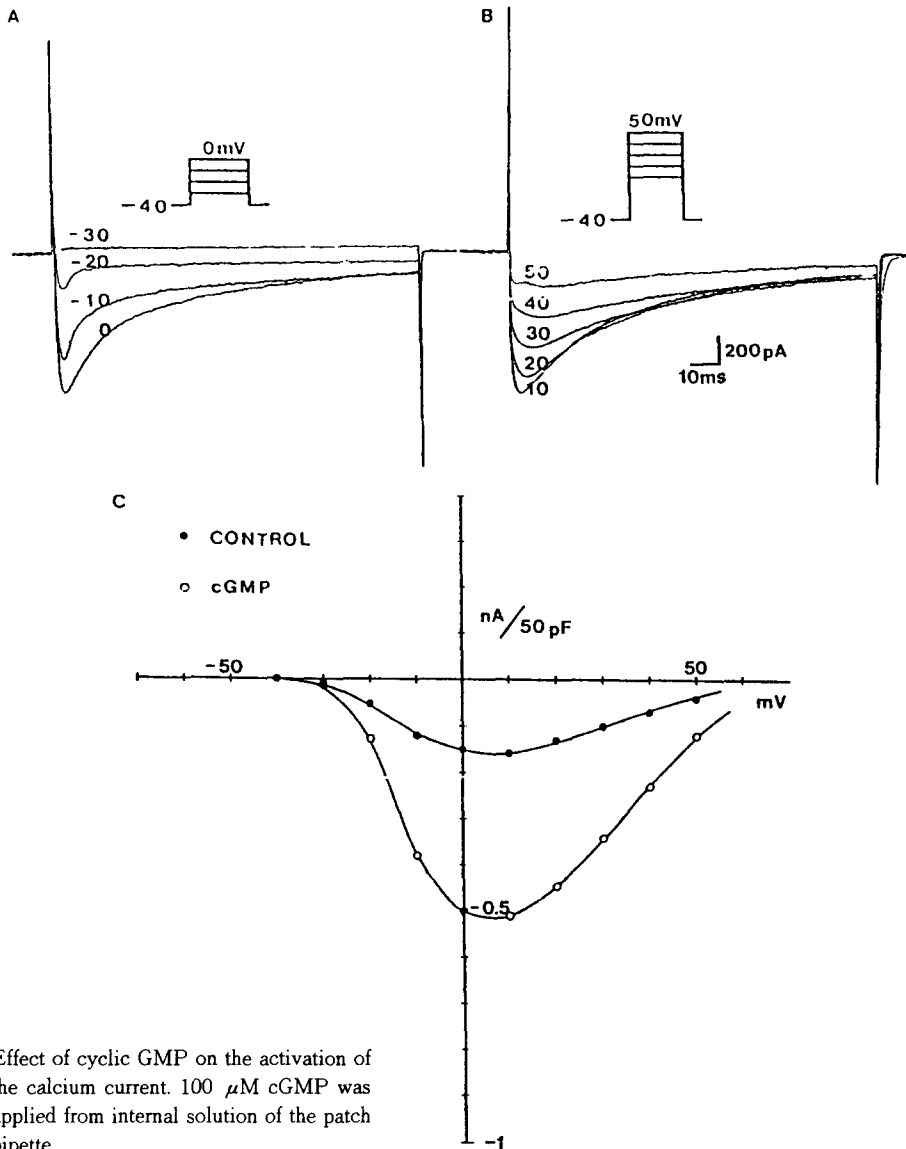


Fig. 3. Effect of cyclic GMP on the activation of the calcium current. $100 \mu\text{M}$ cGMP was applied from internal solution of the patch pipette.

In A and B, Ca^{2+} current traces activated by cGMP at the potential of -30 to $+10$ mV and at $+10$ to $+50$ mV were plotted respectively. In C, I-V curves in control (filled circle) and in cGMP (open circle) were plotted on the normalized current scale with membrane capacitance of 50 pF . Peak current level at $+10$ mV in cGMP was $0.52 \text{ nA} / 50 \text{ pF}$.

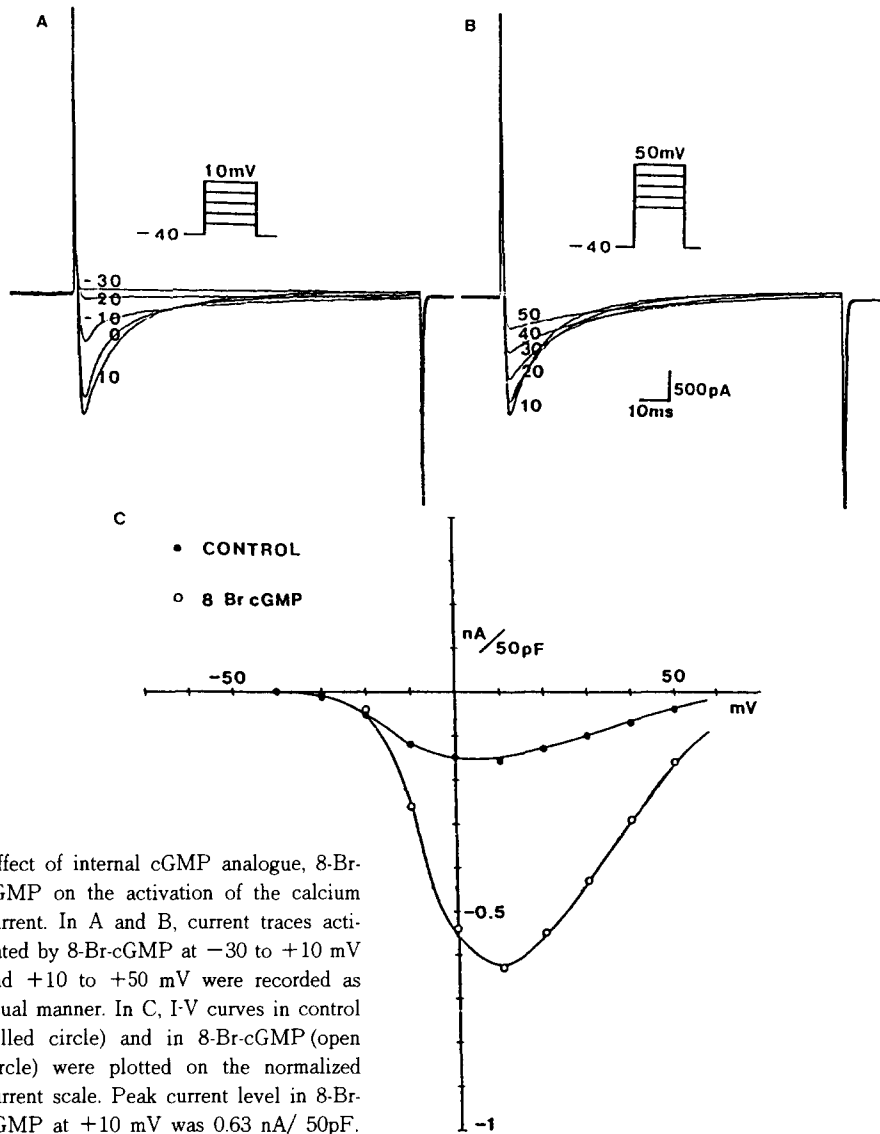


Fig. 4. Effect of internal cGMP analogue, 8-Br-cGMP on the activation of the calcium current. In A and B, current traces activated by 8-Br-cGMP at -30 to $+10$ mV and $+10$ to $+50$ mV were recorded as usual manner. In C, I-V curves in control (filled circle) and in 8-Br-cGMP (open circle) were plotted on the normalized current scale. Peak current level in 8-Br-cGMP at $+10$ mV was 0.63 nA/ 50 pF.

Ca^{2+} 전류를 매우 크게 증가시켰다. 그림 6에 그 결과를 도시하였다. 위 그림은 cAMP와 cGMP가 함께 존재할 때 활성화되는 Ca^{2+} 전류를 보였고 아랫 그림은 대조군과 cAMP + cGMP의 조건에서 기록되는 Ca^{2+} 전류의 I-V curve를 plot 한 것이다.

여기서도 마찬가지로 $+10$ mV에서 최고값을 보였고 그 크기는 약 0.67 nA/ 50 pF였다. 이 크기는 cAMP만 단독으로 존재할 때에 비하여 현저하게 증가된 것이고 cGMP만 단독으로 있을 때에 비해서도 매우 증가된 것이다. 이 결과로 보아 cGMP는 지금

까지 여러 연구자들에 의하여 발표된 결과와는 반대로 단독, 혹은 cAMP와 합동으로 Ca^{2+} 전류를 증가 시킬 수 있었다. 그러나 이런 효과가 토끼 심근에 국한되는 현상인지 혹은 다른 동물의 심근에서도 볼 수 있는지의 여부는 광범위한 실험을 해 보아야 밝힐 수 있을 것으로 생각된다. 세포내로 cAMP와 8-Br-cGMP를 각각 100μ M 투여하였을 때의 결과는 그림 7에 도시하였다. 8-Br-cGMP를 단독으로 처리하였을 경우와 비슷하게 cGMP의 경우보다 Ca^{2+} 전류를 훨씬 크게 증가시켰다. 위 그림은 각 전압에서

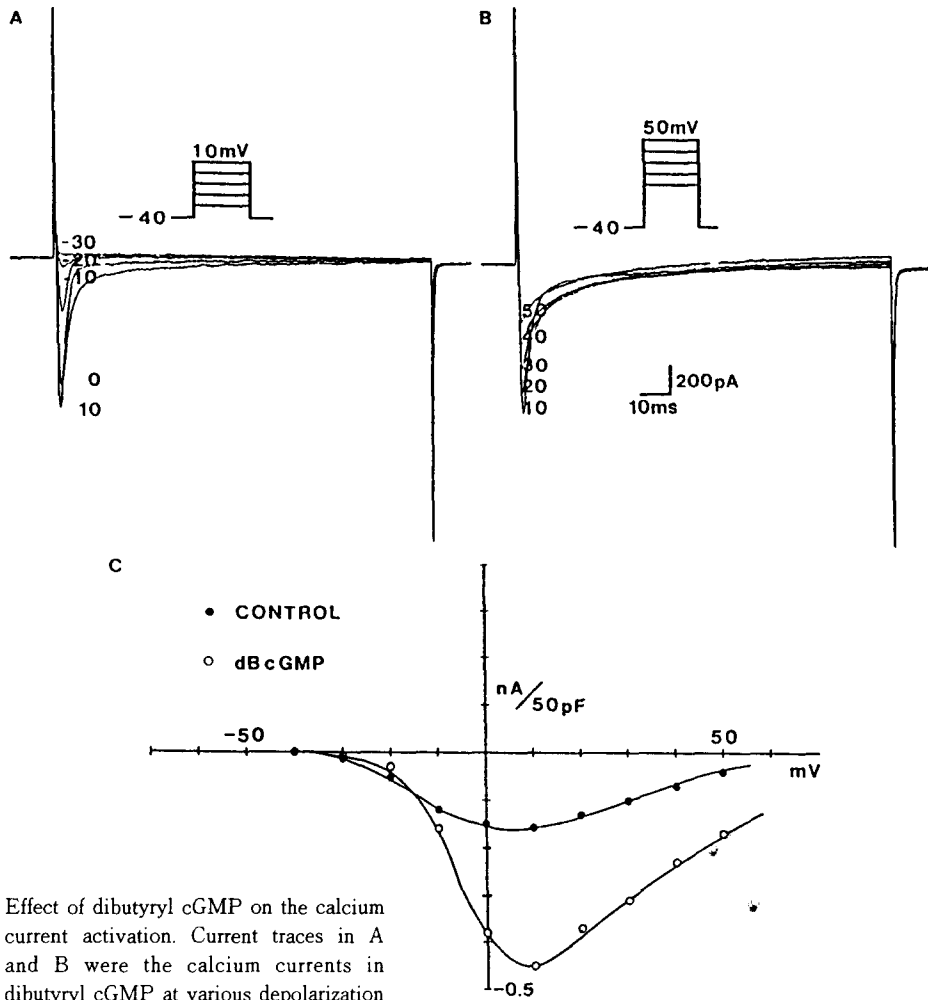


Fig. 5. Effect of dibutyl cGMP on the calcium current activation. Current traces in A and B were the calcium currents in dibutyl cGMP at various depolarization voltages were shown.

The I-V curves in control (filled circle) and in dibutyl cGMP (open circle) were plotted in normalized current scale. The peak value of the calcium current in dibutyl cGMP at +10 mV was 0.45 nA/ 50pF.

의 Ca^{2+} 전류 기록이고 아랫 그림은 I-V curve를 그린 것이다. 이 경우 최고 값은 $-10mV$ 와 $0mV$ 사이에 기록되었고 그 크기는 $0.89nA/50pF$ 였다. 전체적인 I-V curve가 과분극 방향으로 전이된 모습을 보였다. 그러나 이와 같은 전이는 원래 cAMP와 8-Br-cGMP의 효과로 보기보다는 워낙 Ca^{2+} 전류가 커져서 오는 막전압 고정의 escape 현상일 것으로 추측된다. Dibutyl cGMP $100\mu M$ 을 $100\mu M$ 의 cAMP와 같이 투여하였을 경우의 결과를 그림 8에 나타내었다. 그림의 윗부분은 Ca^{2+} 전류의 활성화기록이고 아래 그림은 I-V curve이다. 이 경우에도 Ca^{2+} 전류는 $+10mV$ 에서 최고값을 보였으며 그 크기는 $0.59nA/50pF$ 로

서 cAMP나 dibutyl cGMP만 단독으로 존재할 때에 비하여 증가된 값을 나타내었다.

4) Isoprenaline과 forskolin의 작용

세포내에 cAMP나 cGMP analogue가 존재하는 상태에서 β -agonist인 isoprenaline과 adenylate cyclase activator로 알려진 forskolin을 투여하고 Ca^{2+} 전류에 대한 효과를 관찰하였다. 먼저 그림 9에 cAMP가 존재하는 상태에서 $1\mu M$ 의 isoprenaline을 관류시켰을 때의 실험 결과를 도시하였다. 위의 왼쪽 그림은 $100\mu M$ 의 cAMP 존재하에서 얻어진 Ca^{2+} 전류 기록이고, 오른쪽 그림은 여기에 isoprenaline을 관류

하였을 때의 기록이다. 여기에서의 cAMP에 의한 기록은 isoprenaline 투여 직전의 기록으로 아래 I-V curve에 잘 나타나 있듯이 +20mV에서의 최고값이 0.25nA/ 50pF로서 어느 정도 run down된 상태임을 알 수 있다. 세포를 isoprenaline으로 관류하면 약간 Ca²⁺ 전류의 크기가 증가하나(0.28nA/ 50pF), 현저히 증가하는 아니고 cAMP가 없이 정상 대조군에서 isoprenaline을 투여하였을 때의 Ca²⁺ 전류 증가(보통 3배 이상 증가)에 비하여 매우 작은 편이었다. 이는

아마도 cAMP에 의하여 desensitization이 일어났기 때문인 것으로 생각된다. 세포내에 cGMP가 존재하는 상태에서 isoprenaline을 관류한 실험결과를 그림 10에 도시하였다. 그림 10-A에는 cGMP가 세포내에 존재할 때의 Ca²⁺ 전류 기록이고 그림 10-B는 여기에 1 μM의 isoprenaline을 관류할 때 나타나는 Ca²⁺ 전류 기록이다. 경우에 따라서는 크게 Ca²⁺ 전류가 증가하는 수도 있었으나 대개는 약간 증가하는 경우가 대부분이었다. 그림 10-C에 I-V curve를 plot하였

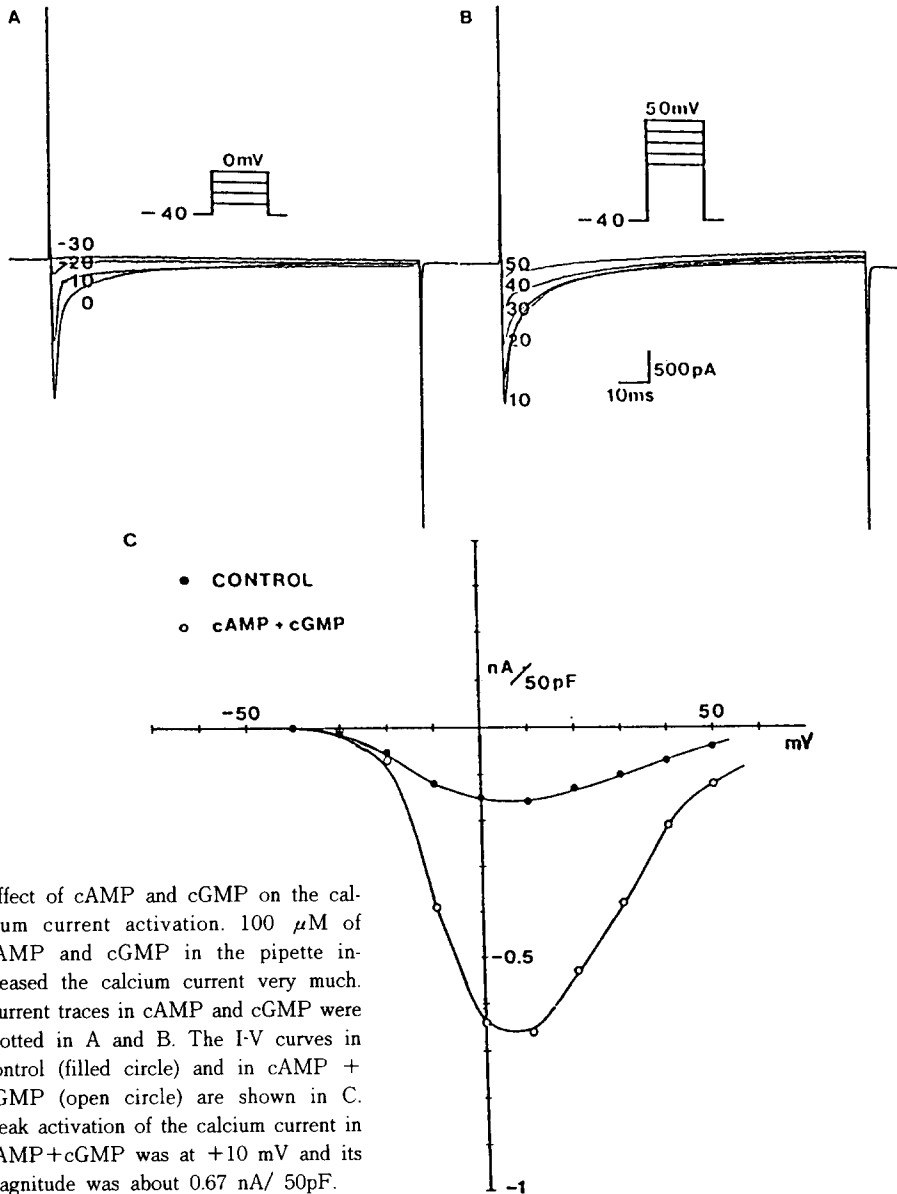


Fig. 6. Effect of cAMP and cGMP on the calcium current activation. 100 μM of cAMP and cGMP in the pipette increased the calcium current very much. Current traces in cAMP and cGMP were plotted in A and B. The I-V curves in control (filled circle) and in cAMP + cGMP (open circle) are shown in C. Peak activation of the calcium current in cAMP+cGMP was at +10 mV and its magnitude was about 0.67 nA/ 50pF.

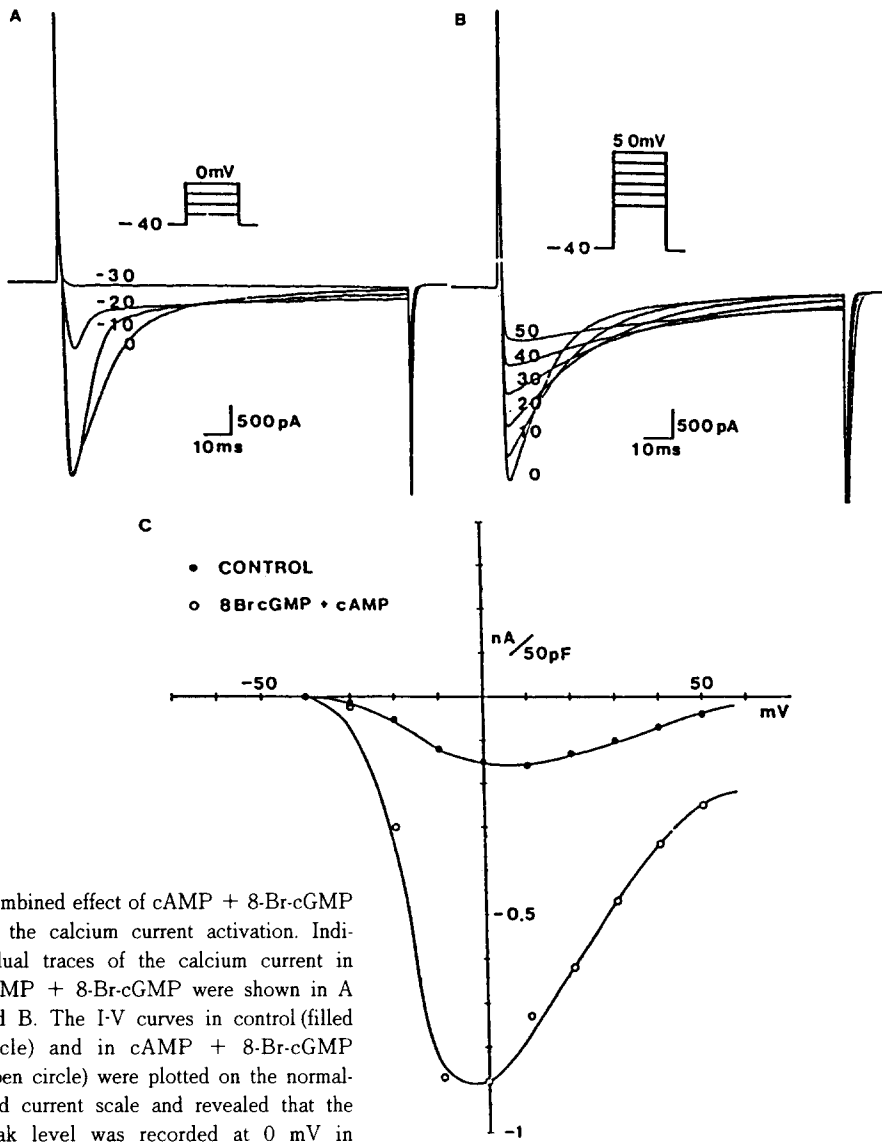


Fig. 7. Combined effect of cAMP + 8-Br-cGMP on the calcium current activation. Individual traces of the calcium current in cAMP + 8-Br-cGMP were shown in A and B. The I-V curves in control (filled circle) and in cAMP + 8-Br-cGMP (open circle) were plotted on the normalized current scale and revealed that the peak level was recorded at 0 mV in cAMP and 8-Br-cGMP.

I-V curve in cAMP + 8-Br-cGMP was shifted to the left and it is thought that this is owing to the voltage escape during huge current activation by these second messengers.

는데 cGMP만 존재하는 대조군에서는 10mV에서 최고값을 보여 0.51nA/50pF의 Ca^{2+} 전류가 활성화되었으나 isoprenaline으로 관류하였을 때에는 0mV에서 최고값을 보였으며 그 크기는 0.57nA/50pF였다. 이 결과는 cAMP와 cGMP가 동시에 존재할 때에 비하여 전류 활성화 정도가 적음을 나타낸다. 그러나 두 실험군 사이의 차이는 근본기전의 차이로 나타난 것이라고 보기는 어렵고 run down 현상이나 desensi-

tization 정도의 차이에서 온 것으로 생각된다.

그림 10에서와 같은 조건, 즉 세포내에 cGMP가 존재하는 상태에서 adenylate cyclase activator로 알려진 forskolin $1\mu M$ 을 투여하였을 때 얻은 실험결과를 그림 11에 나타내었다. 그림 11-A는 cGMP만 있을 때의 Ca^{2+} 전류 활성화 기록이고, 그림 11-B는 여기에 forskolin을 투여하였을 때의 기록을 그린 것이다. 그림 11-C에 I-V curve를 도시하였는데 cGMP 조건

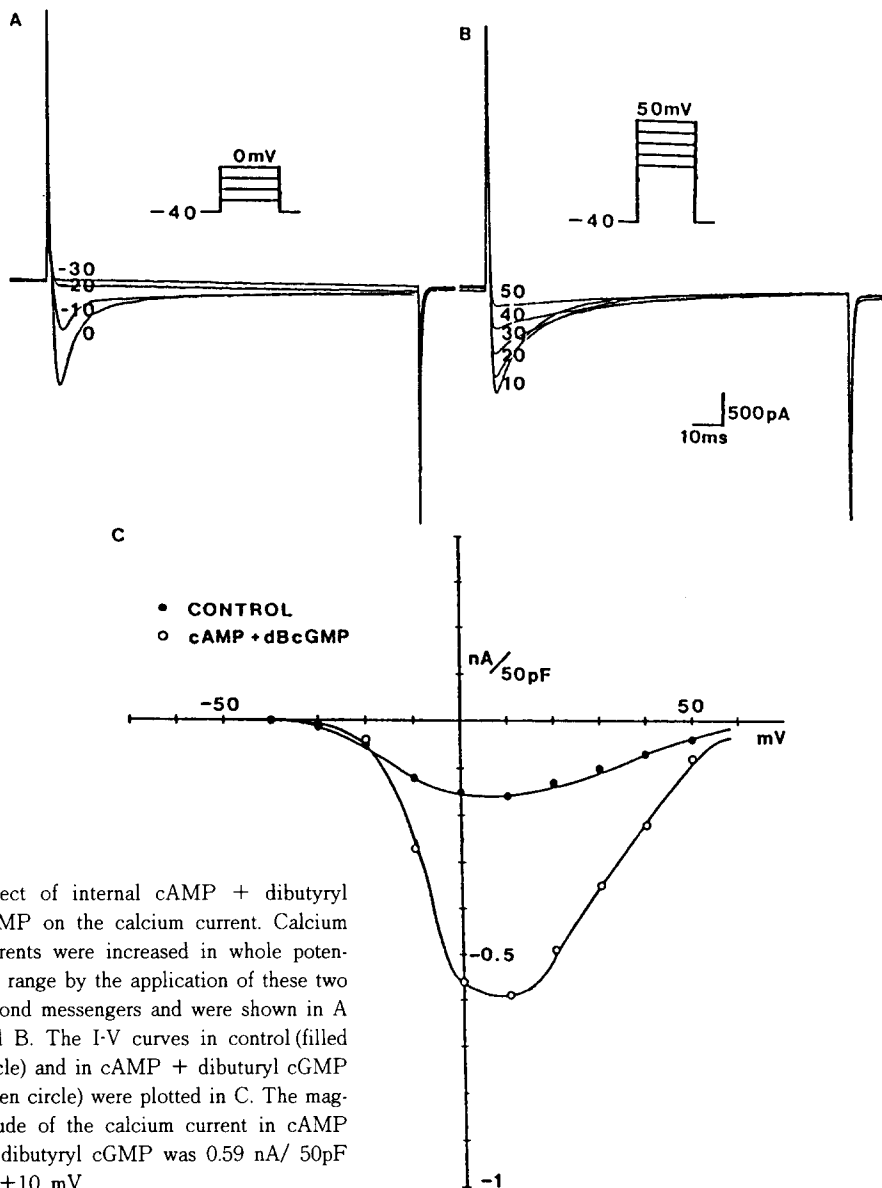


Fig. 8. Effect of internal cAMP + dibutyryl cGMP on the calcium current. Calcium currents were increased in whole potential range by the application of these two second messengers and were shown in A and B. The I-V curves in control (filled circle) and in cAMP + dibutyryl cGMP (open circle) were plotted in C. The magnitude of the calcium current in cAMP + dibutyryl cGMP was 0.59 nA/ 50pF at +10 mV.

에서 Ca^{2+} 전류는 0mV에서 최고치를 보였고 그 크기는 0.5nA/ 50pF였고 forskolin 투여에 의하여 0.65nA/ 50pF로 그 크기가 증가하였다. 이 경우 Ca^{2+} 전류는 비 활성화가 매우 빨랐는데 세포에 따른 차이인 것 같다. 그리고 Ca^{2+} 전류의 최고값이 0mV에서 활성화되었는데 이는 약간의 voltage escape 때문에 초래된 현상으로 생각된다.

이번에는 세포내 cGMP analogue 인 8-Br-cGMP에 의한 효과를 그림 12에 보였다. 그림 12-A는 세포

내에 8-Br-cGMP가 존재할 때의 Ca^{2+} 전류 활성화 기록이고 그림 12-B는 여기에 isoprenaline을 투여하였을 때의 기록이다. 그림 12-C에 I-V curve를 도시하여 두 조건에서의 막전압에 따른 Ca^{2+} 전류의 활성화의 차이를 나타내었다. 8-Br-cGMP 조건에서 Ca^{2+} 전류는 +10mV에서 최고값을 보였으며, 그 크기는 0.63nA/ 50pF였다. 한편 isoprenaline에 의하여 Ca^{2+} 전류는 크게 증가하였다. 그리고 최고값이 0mV에서 나타났고 그 크기는 0.94nA/ 50pF였다. 이렇게 최고

값이 0mV로 이동한 것은 전류의 크기가 너무 커서 voltage escape가 생겼기 때문에 나타난 현상이라고 생각된다. 그러나 전 범위에서 현저한 증가를 볼 수 있었다. 그림 13은 세포내 dibutyryl cGMP가 있을 때의 기록이다. 그림 13-A는 dibutyryl cGMP 100 μ M이 존재할 때 Ca^{2+} 전류가 활성화되는 양상을 나타낸 것이고, 그림 13-B는 여기에 isoprenaline을 투여하였을 때의 기록이다. 전체적으로 Ca^{2+} 전류의 비활성화가 빠르게 일어나고 있음을 보여주나 이것도 세포사이의 차이로 생각된다. 그림 13-C에 I-V curve를 그렸다. Dibutyryl cGMP만 있을 경우에는 +10mV에서 최고값을 나타내었고 그 크기는 0.45nA/50pF

었다. Isoprenaline 투여시 Ca^{2+} 전류가 증가하였고 최고치는 0mV에서 기록되었으며 그 크기는 0.61nA/50pF였는데 전체 I-V curve가 왼쪽으로 이동된 양상을 보였다. 그러나 이 경우도 voltage escape로 밖에는 설명할 수 없을 것 같다.

이상의 cAMP나 cGMP의 존재하에서 isoprenaline이나 forskolin이 추가로 Ca^{2+} 전류를 증가시키는 것으로 보아 Ca^{2+} 통로에 대한 이차 전령기 조절기전은 지금까지 알려진 것보다는 훨씬 복잡하고 단순한 음양 기전으로는 설명이 될 수 없음을 시사한다.

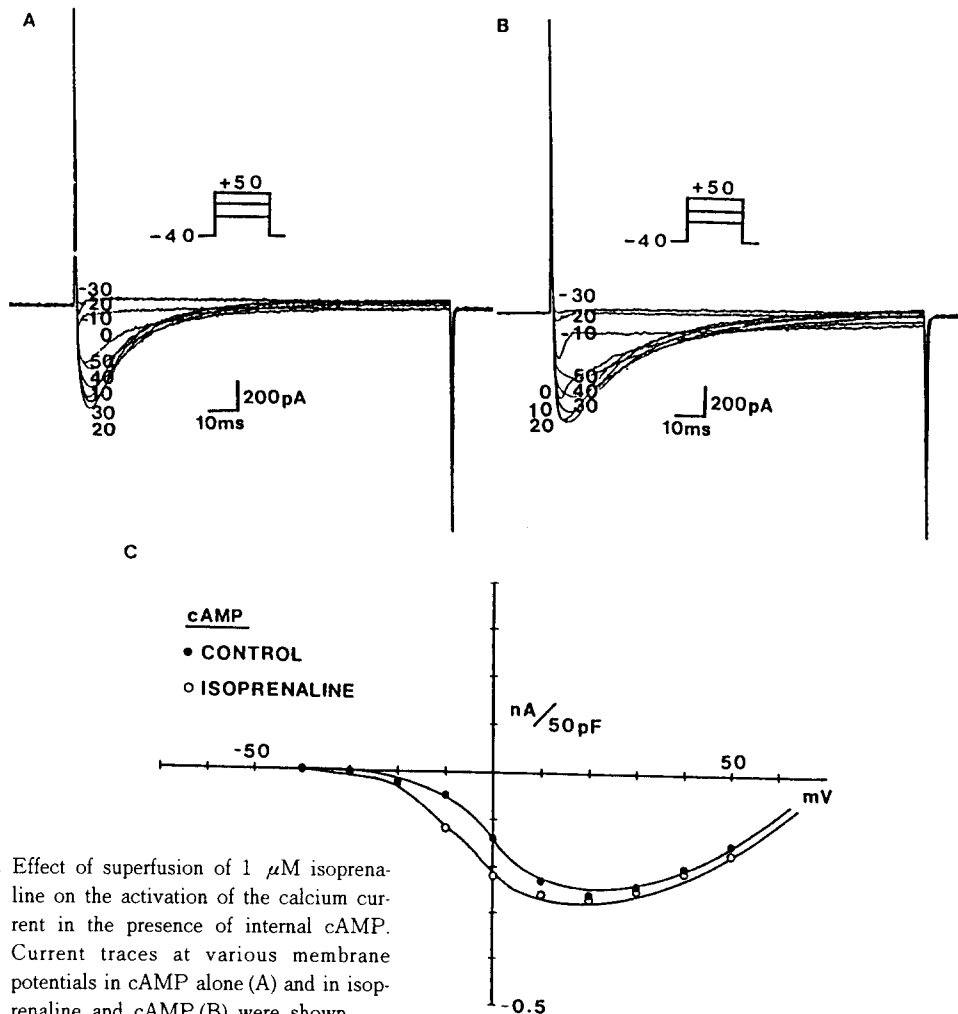


Fig. 9. Effect of superfusion of 1 μ M isoprenaline on the activation of the calcium current in the presence of internal cAMP. Current traces at various membrane potentials in cAMP alone (A) and in isoprenaline and cAMP (B) were shown.

The magnitude of the calcium current increased slightly by the superfusion of isoprenaline and their I-V relations were plotted in C (filled circle indicates I-V curve in cAMP alone and open circle that in isoprenaline + cAMP).

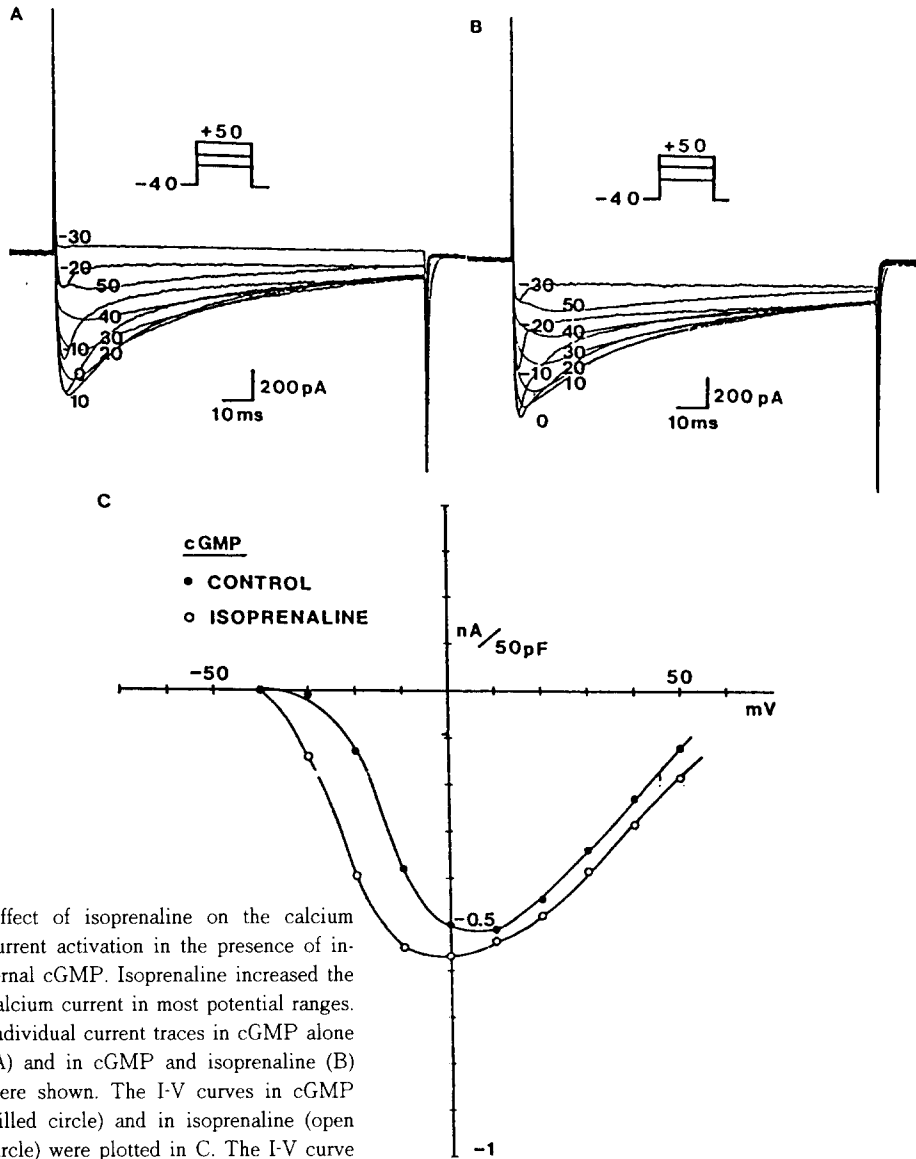


Fig. 10. Effect of isoprenaline on the calcium current activation in the presence of internal cGMP. Isoprenaline increased the calcium current in most potential ranges. Individual current traces in cGMP alone (A) and in cGMP and isoprenaline (B) were shown. The I-V curves in cGMP (filled circle) and in isoprenaline (open circle) were plotted in C. The I-V curve was shifted to the left by isoprenaline.

5. 고 찰

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다. 1) 단일 토끼 심실근 세포에서 cAMP 단독으로는 β -agonist 인 isoprenaline 만큼 Ca^{2+} 전류 증가가 나타나지 않았다. 2) cGMP의 존재시에 cAMP는 거의 isoprenaline 정도의 Ca^{2+} 전류 증가를 일으켰다. 3) cGMP 단독으로도 Ca^{2+} 전류의 증가 효과를 볼 수 있었으며 그 정도는 cAMP 보다 더 컸다.

4) cGMP 유도체인 dibutyryl cGMP는 cGMP 보다 효과가 작았다. 그러나 8-Br-cGMP는 cGMP에 비하여 Ca^{2+} 전류 증가 효과가 컸다. 5) cGMP 존재 시 cAMP의 첨가나 isoprenaline 혹은 forskolin 처리는 현저한 Ca^{2+} 전류의 증가를 일으켰다.

cGMP는 처음 발견된 후부터 많은 연구자들이 그 효과와 작용기전에 대한 실험을 꾸준히 진행시켜 왔다. Goldberg et al.(1975)은 그때까지의 실험결과들을 바탕으로, cGMP는 cAMP의 작용을 길항한다는 '음양설'(Ying-Yang hypothesis)을 제창하였다⁸⁾. 그

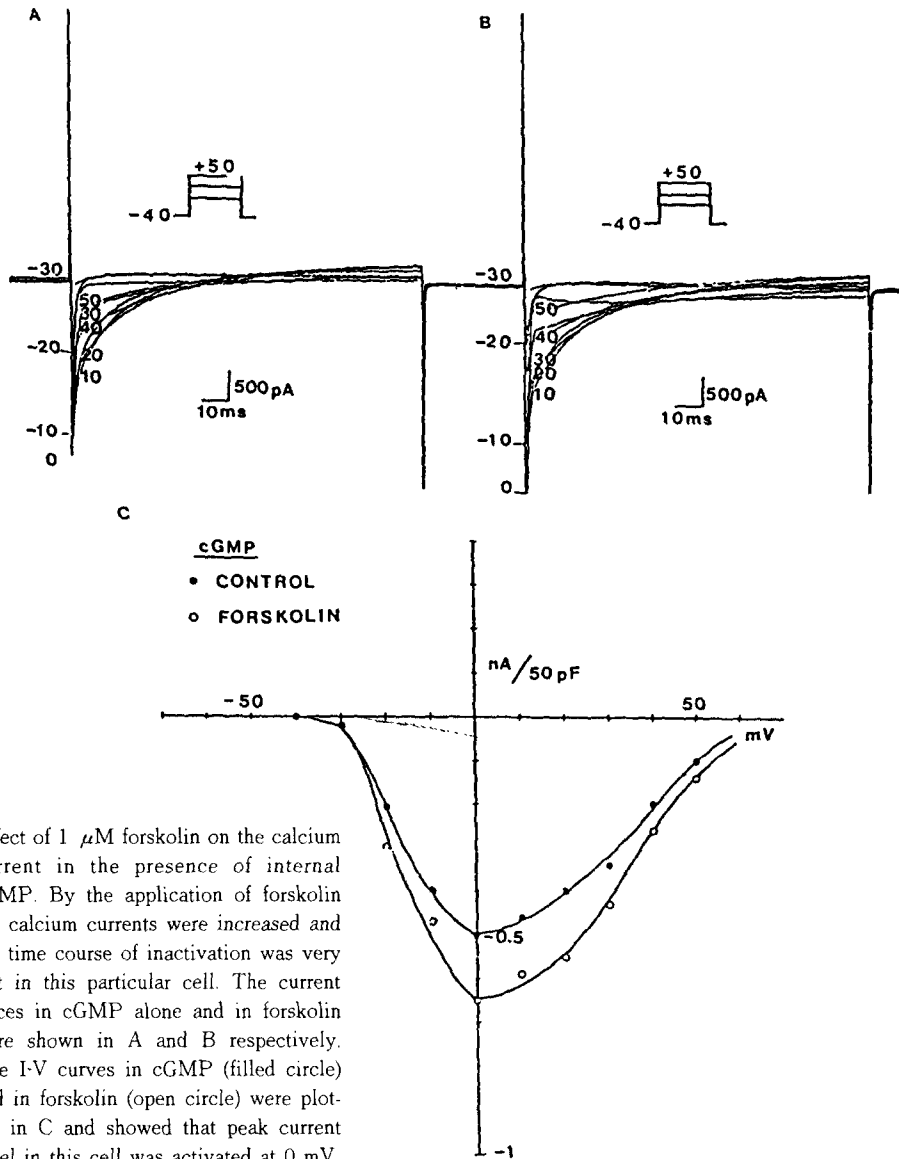


Fig. 11. Effect of 1 μ M forskolin on the calcium current in the presence of internal cGMP. By the application of forskolin the calcium currents were increased and the time course of inactivation was very fast in this particular cell. The current traces in cGMP alone and in forskolin were shown in A and B respectively. The I-V curves in cGMP (filled circle) and in forskolin (open circle) were plotted in C and showed that peak current level in this cell was activated at 0 mV.

러나 '음양설'은 cGMP의 작용을 잘 설명해 줄 수 없었으며 조직에 따라 여러가지 다른 실험결과들이 발표됨에 따라 다른 각도에서 cGMP의 효과 및 작용 기전에 대한 실험들이 진행되기 시작했다.

그러나 cGMP에 대한 연구는 다음과 같은 이유에서 그 진보가 대단히 느리게 발전하여 왔다. 즉 1) cGMP 농도를 조절하는 과정이 단순치 않고 매우 복잡하며 수용체들도 guanylate cyclase 및 cGMP에 specific 한 phosphodiesterase와 연관되어 있고 2) 세포내 이차전령으로서의 작용은 protein kinase를 통한 기전 이외에도 여러가지 cGMP 의존성 효소와 통

로를 통한다는 점 3) 여러 효소들이 극히 좁은 공간에 compartmentalize 되어 있는 점 4) cGMP 통로를 활성화시키는 ligand가 적고 비교적 최근에야 발견된 점⁹⁾ 등이다.

지금까지 척추동물에서 cGMP의 작용이나 기능으로 제시된 것을 보면 주로 phototransduction에서의 역할, 스테로이드 호르몬 합성조절, 신장에서의 이뇨 혹은 natriuresis 조절, 장 흡수기능 조절, 평활근 tone의 조절 등으로 요약된다^{4,28)}. 그러나 이런 작용들은 어떤 일정한 대사과정을 조절함으로써 효과를 나타내는 것이 아니고 경우에 따라서는 동일 조직에

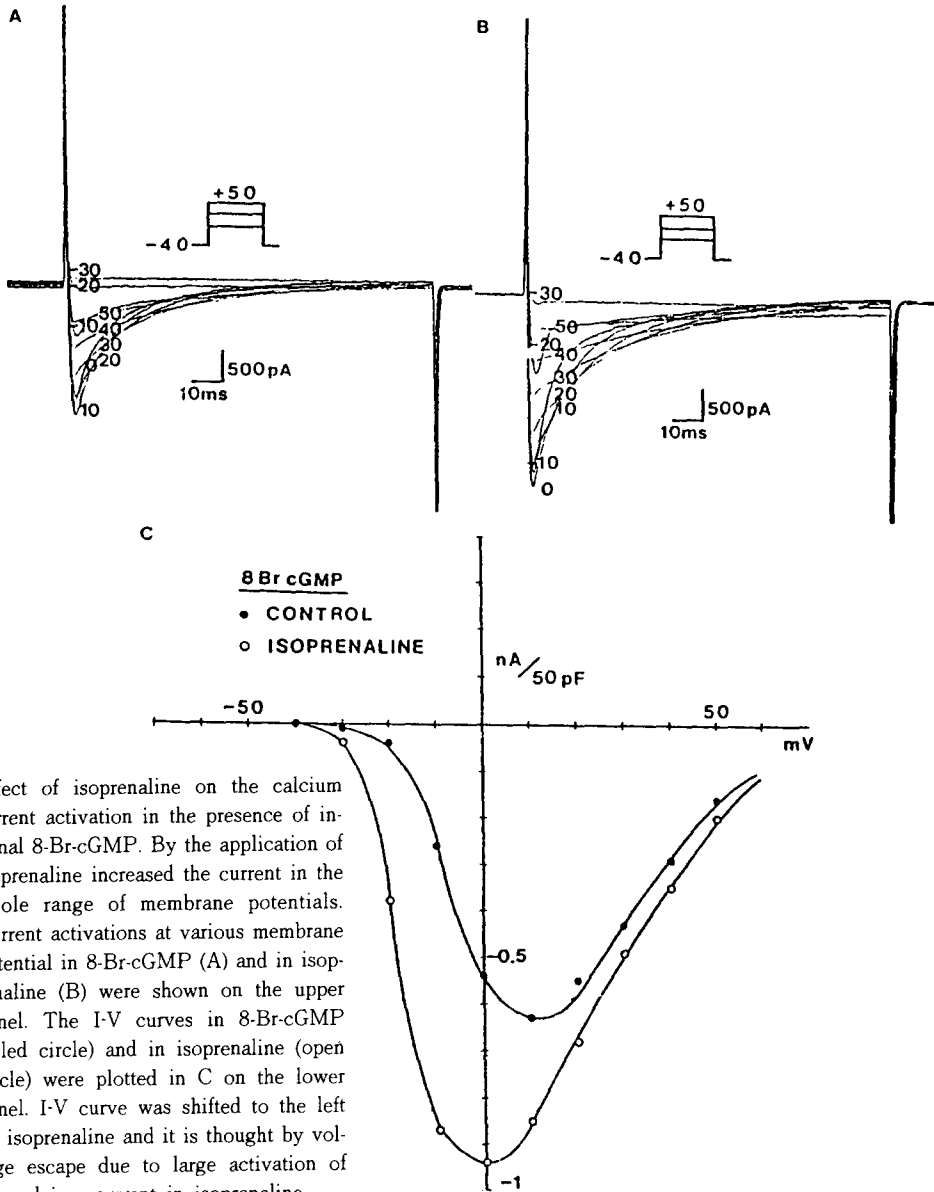


Fig. 12. Effect of isoprenaline on the calcium current activation in the presence of internal 8-Br-cGMP. By the application of isoprenaline increased the current in the whole range of membrane potentials. Current activations at various membrane potential in 8-Br-cGMP (A) and in isoprenaline (B) were shown on the upper panel. The I-V curves in 8-Br-cGMP (filled circle) and in isoprenaline (open circle) were plotted in C on the lower panel. I-V curve was shifted to the left by isoprenaline and it is thought by voltage escape due to large activation of the calcium current in isoprenaline.

서도 여러 효소계에 작용을 나타내어 복잡한 효과를 나타냄이 알려져 있다. 예를 들면 망막에서 cGMP-dependent protein kinase와 여러 기질 단백질이 존재하지만 Na/Ca 교환기전을 조절하는 데에는 무관함이 알려졌다^{5,18}, 심장에서도 동일 효소와 기질 단백질이 알려져 있지만³⁰ cGMP의 심근에 대한 작용은 protein kinase나 기질단백의 인산화보다는 다른 기전들이 제시되었다. Hartzell and Fischmeister (1986) 및 Fischmeister and Hartzell(1987)은 개구리

의 단일 심실근 세포를 사용한 실험에서 Ca^{2+} 전류에 대한 cGMP의 작용기전은 cGMP-stimulated PDE에 의해서 설명될 수 있다고 주장했으며^{6,12}, 그 이유로 다음과 같은 실험 사실들을 들었다. 첫째, cAMP가 존재할 때만 cGMP의 억제작용이 나타났다. 둘째, 가수분해되지 않는 8-bromo-cAMP를 사용하면 cGMP는 아무런 효과가 없었다. 셋째, cGMP 유도체지만 PDE를 활성화시키지 못하고 PK만 활성화시킬 수 있는 8-bromo-cGMP는 아무런 효과도 나타내

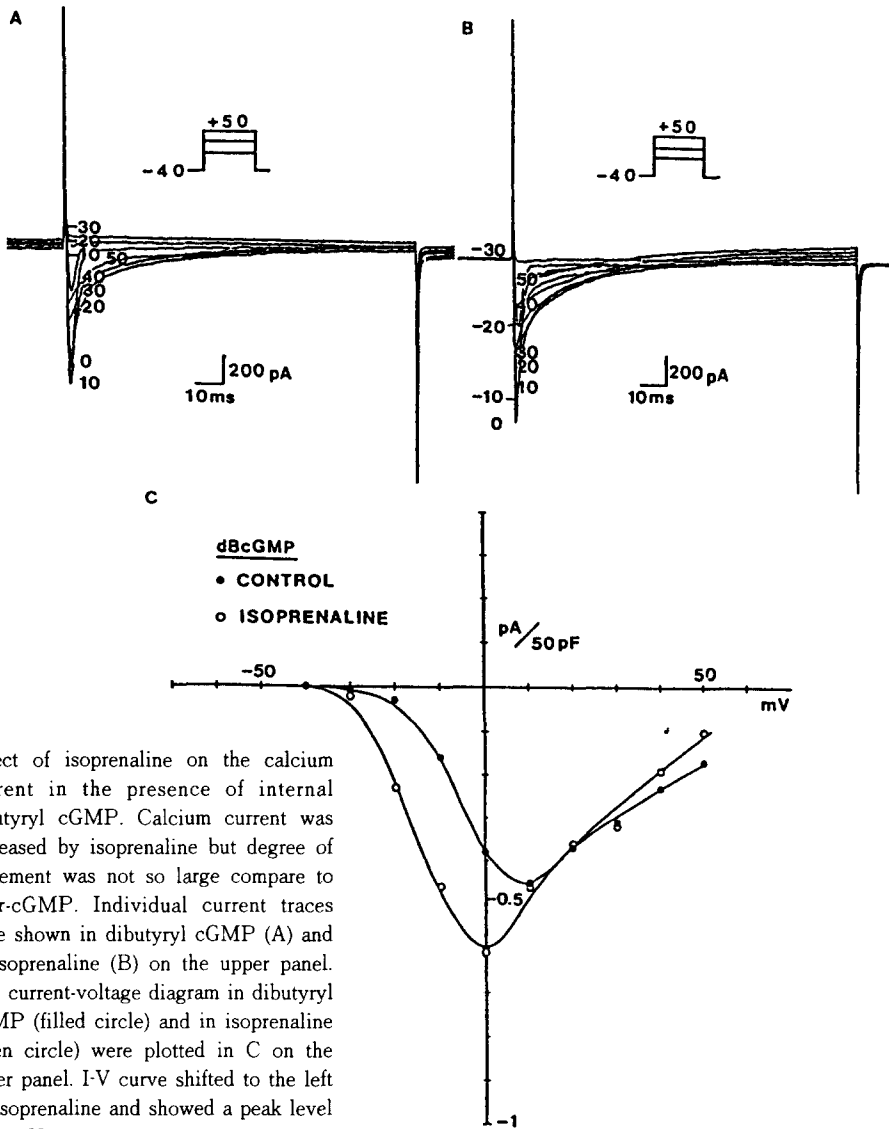


Fig. 13. Effect of isoprenaline on the calcium current in the presence of internal dibutyryl cGMP. Calcium current was increased by isoprenaline but degree of increment was not so large compare to 8-Br-cGMP. Individual current traces were shown in dibutyryl cGMP (A) and in isoprenaline (B) on the upper panel. The current-voltage diagram in dibutyryl cGMP (filled circle) and in isoprenaline (open circle) were plotted in C on the lower panel. I-V curve shifted to the left by isoprenaline and showed a peak level at 0 mV.

지 못했다. 넷째, PDE 억제제인 IBMX (isobutyl-methyl-xanthine)는 cGMP의 효과를 억제할 수 있었다.

그러나 같은 그룹인 Levi et al.(1989)은 guinea-pig의 단일 심실근 세포를 사용한 실험으로부터, 포유류에서 Ca^{2+} 전류에 대한 cGMP의 효과는 cGMP-dependent PK 또는 그 이후의 과정에 관여하는 것으로 설명될 수 있다는 실험결과를 발표했다⁶⁾. 그 이유는 첫째, guinea-pig에서도 cAMP가 존재할 때만 cGMP의 억제 작용이 나타났지만 8-bromo-cGMP도 Ca^{2+} 전류의 크기를 감소시켰으며, 셋째, IBMX

가 cGMP의 효과를 억제하지 못했기 때문이었다. 또한 Wahler et al.(1990)은 chick embryo를 사용한 실험에서 cAMP가 존재하지 않은 상태에서도 cGMP가 Ca^{2+} 전류의 크기를 감소시킨다는 결과를 발표했다²⁹⁾. 최근의 이러한 실험 결과들은 cGMP의 작용기전이 한 가지가 아니라 동물의 종이나 조직마다 틀릴 수 있다는 것을 보여준다고 할 수 있을 것이다.

위에서 언급한 실험결과들은 주로 양서류나 기니픽 심근 세포에서, 실험조건은 실온에서 얻어진 것들이기 때문에 본 연구 결과와 직접적으로 비교하기는 쉽지 않다. 그러나 토끼 심실근에서는 cGMP가

단독으로 혹은 cAMP와 함께 Ca^{2+} 전류를 증가시키고, 이러한 효과는 실온에서나 체온에서 동일한 결과를 보이는 것으로 보아 다른 연구자들이 발표한 것과는 반대의 결과를 얻었다. 따라서 cGMP의 작용을 cGMP-stimulated phosphodiesterase를 경유하여 일어난다는 설명은 적어도 토끼 심실근에서는 맞지 않음을 알 수 있었다. 그리고 cAMP와 서로 synergistic하게 작용을 나타내고, cGMP, 특히 8-Br-cGMP는 단독으로도 Ca^{2+} 전류를 증가시키는 효과를 나타내는 것으로 보아 cGMP-dependent protein kinase를 통하여 작용을 나타낼 가능성이 많은 것으로 생각된다. β -agonist 인 isoprenaline이 cAMP와 8-Br-cGMP가 같이 존재할 경우를 제외하고 거의 모든 경우 부가적으로 Ca^{2+} 전류를 증가시키는 것으로 보아 β -agonist의 작용도 이제까지 알려진 cAMP와 cAMP-dependent protein kinase를 통한 기전³⁾만으로는 본 연구 결과를 설명할 수 없었다. 또한 cGMP 존재하에 adenylate cyclase activator 인 forskolin이 더욱 Ca^{2+} 전류를 크게 하는 것으로 미루어 보아 cAMP-dependent protein kinase를 통한 경로 이외에 Ca^{2+} 통로를 인산화하거나 혹은 다른 기전을 통하여 Ca^{2+} 통로를 활성화하는 경로가 있음을 시사하여 준다.

현재로서는 cGMP-dependent PK에 의해 인산화되는 부분이 아직 완전히 분리되어 있지 못하고, 어떤 효과가 있는 지에 대해서도 아직 알려져 있지 않은 실정이기 때문에 cGMP-stimulated protein kinase를 선택적으로 억제할 수 있는 차단제나 cGMP 의존성 경로를 차단하는 물질을 이용하여 세포내의 작용 경로를 구명해 나가야 될 것으로 생각된다. 그러나 아직은 각 protein kinase나 cGMP의 작용 경로들이 완전히 밝혀지지 않았고 이들에 선택적으로 작용하는 물질들이 모두 개발되지는 않았기 때문에 좀 더 자세한 기전을 밝히기는 어려울 것 같다.

6. 결 론

토끼 심실근에서 세포내 이차전령으로 알려진 cyclic GMP의 Ca^{2+} 통로에 대한 효과를 밝히기 위하여 Collagenase 처리에 의하여 단일 세포를 분리하고 whole cell patch clamp 방법으로 Ca^{2+} 전류를 기록 분석하였다. cGMP의 세포내 작용을 알기 위하여 cAMP, dibutyryl cGMP, 8-bromo-cGMP, isoprenali-

ne 및 forskolin을 이용 Ca^{2+} 전류에 대한 효과를 상호 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) patch pipette을 통하여 K^+ 전류를 억제한 다음 유지전압 $-40mV$ 에서 $10mV$ 간격의 저분극 pulse를 주어 Ca^{2+} 전류를 활성화시켰다. Ca^{2+} 전류는 $-30mV$ 에서 부터 활성화되어 점차 증가하여 $+10mV$ 에서 최고값을 보였으며 더 큰 저분극 pulse에 의해서는 점차 감소하여 대략 $60mV$ 근처에서 역전되었다. $+10mV$ 에서의 최고값을 세포막 capacitance $50pF$ 당으로 표준화하였을 때 Ca^{2+} 전류의 크기는 $0.15nA$ 가량을 나타내었다.

2) 세포내로 $100\mu M$ 의 cAMP를 투여하였을 때 Ca^{2+} 전류의 크기는 $0.32nA/50pF$ 가량으로 증가하였으며 $1\mu M$ 의 isoprenaline에 의하여 약간 그 크기가 증가하였다.

3) 세포내로 $100\mu M$ 의 cGMP만 투여하였을 경우에도 Ca^{2+} 전류가 대조군에 비하여 증가하였고 그 크기는 약 $0.52nA/50pF$ 로서 cAMP에 비하여서도 더욱 증가하였다. 여기에 $1\mu M$ 의 isoprenaline을 투여하였을 때는 Ca^{2+} 전류의 증가는 현저하지 않았으나, adenylate cyclase를 활성화시키는 forskolin($1\mu M$)의 투여는 Ca^{2+} 전류를 크게 하였다($0.64nA/50pF$).

4) 세포내에 cAMP와 cGMP(각 $100\mu M$)가 존재할 때에는 Ca^{2+} 전류가 증가하였고 그 크기는 약 $0.67nA/50pF$ 로서 cAMP나 cGMP가 단독으로 존재할 때에 비하여 그 크기가 증가하였다.

5) cGMP-stimulated protein kinase에 cGMP 보다 더 큰 자극효과를 갖는 8-bromo-cGMP를 투여하였을 때 Ca^{2+} 전류는 약 $0.63nA/50pF$ 로서 cGMP의 Ca^{2+} 전류 증가효과보다 더욱 그 효과가 컸다. 여기에 cAMP를 첨가하였을 때 Ca^{2+} 전류는 $0.89nA/50pF$ 로 증가하였다. isoprenaline을 투여하였을 경우에는 Ca^{2+} 전류가 $0.94nA/50pF$ 로 증가하였다.

6) cGMP 의존성 protein kinase나 phosphodiesterase에 전혀 작용하지 않는 dibutyryl cGMP는 대조군에 비하여 Ca^{2+} 전류를 증가시켰으며($0.45nA/50pF$), cAMP가 함께 존재할 때에는 $0.59nA/50pF$ 로 증가하였고, isoprenaline에 의해서도 Ca^{2+} 전류가 증가하였다($0.61nA/50pF$).

이러한 결과들은 실온에서나 체온 수준에서 차이를 보이지 않고 있었다.

이상의 결과로 보아 cGMP는 단독으로도 Ca^{2+} 전류를 증가시켰고 cAMP의 존재 하에서는 Ca^{2+} 전류

를 더욱 크게하였다. 이러한 cGMP의 효과는 cAMP에 의한 Ca^{2+} 통로 인산화 과정과는 다른 cGMP 의존성 단백 인산화과정을 통하여 나타나는 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bkaily G and Sperelakis N.: *Injection of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels. Am J Physiol. H745-H749, 1985.*
- 2) Cohen P.: *The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature. 296 : 613-620, 1982.*
- 3) Earm YE, Ho WK and So IS.: *Inward current generated by Na-Ca exchange during the action potential in single atrial cells of the rabbit. Proc R Soc Lond B. 240 : 61-81, 1990.*
- 4) Fain GL and Matthews HR.: *Calcium and the mechanism of light adaptation in vertebrate photoreceptors. Trends in Neurosci. 13 : 378-384, 1990.*
- 5) Farber DB, Brown BM and Lolley RN.: *Cyclic nucleotide dependent protein kinase and the phosphorylation of endogenous proteins of retinal outer segments. Biochemistry 18 : 370-378, 1979.*
- 6) Fischmeister R and Hartzell HC.: *Cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. J Physiol. 387 : 453-472, 1987.*
- 7) Goldberg ND and haddox MK.: *Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. Ann Rev Biochem. 46 : 823-896, 1977.*
- 8) Goldberg ND, Haddox MK, Nicol SE, Glass DB, Stanford CH, Kuchl Jr FA and Estensen R.: *Biological regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Ying-Yang hypothesis. Adv Cyclic Nucleotide Res. 5 : 307-299, 1975.*
- 9) Goy MF. cGMP: *The wayward child of the cyclic nucleotide family. Trends in Neurosci. 14 : 293-299, 1991.*
- 10) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ.: *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 395 : 6-18, 1981.*
- 11) Hartzell HC.: *Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. Progress in Biophysics & Molecular Biology. 52 (3) : 165-247, 1988.*
- 12) Hartzell HC and Fischmeister R.: *Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca current in single heart cells. Nature 323 : 273-275, 1986.*
- 13) Hartzell HC, Mery PF, Fischmeister R and Szabo G.: *Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. Nature 351 : 573-576, 1991.*
- 14) Imoto Y, Yatani A, Reeves JP, Codina J, Birnbaumer L and Brown AM.: *α -subunit of Gs directly activates cardiac calcium channels in lipid bilayers. Am J Physiol. 255 : H722-H728, 1988.*
- 15) Kaczmarck LK.: *The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. Trends in Neurosci. 10 : 30-34, 1987.*
- 16) Levi RC, Alloatti G and Fischmeister R.: *Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. Pflugers Arch. 413 : 685-687, 1989.*
- 17) Pelzer S, Shuba YM, Asai T, Codina J, Birnbaumer L, McDonald TF and Pelzer D.: *Membrane-delimited stimulation of heart cell calcium current by β -adrenergic signal-transducing Gs protein. Am J Physiol. 259 : H264-H267, 1990.*
- 18) Polans AS, Hermolin J and Bownds MD.: *Light-induced dephosphorylation of two proteins in frog rod outer segments. J Gen Physiol. 74 : 595-613, 1979.*
- 19) Reuter H.: *Properties of two membrane currents in the heart. Ann Rev Physiol. 41 : 413-424, 1979.*
- 20) Reuter H.: *Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. Nature. 301 : 569-574, 1983.*
- 21) Reuter H.: *Modulation of ion channels by phosphorylation and second messengers. News in Physiol Sci. 2 : 168-171, 1987.*
- 22) Sato R, Noma A, Kurachi Y and Irisawa H.: *Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea-pig. Circ Res. 57 : 553-561, 1985.*
- 23) Shuba YM, Hesslinger B, Trautwein W, McDonald T and Pelzer D.: *Whole-cell calcium current in guinea-pig ventricular myocytes dialysed with guanosine nucleotides. J Physiol. 424 : 205-228, 1990.*
- 24) Soejima M and Nama A.: *Mode of regulation of the Ach-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. Pflugers Arch. 400 : 424-431, 1984.*
- 25) Tsien RW.: *Calcium channels in excitable cell membranes. Ann Rev Physiol. 45 : 341-358, 1983.*
- 26) Trautwein W and Hescheler JA.: *Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and*

- G-protein. Ann Rev Physiol. 52 : 257-274, 1990.*
- 27) Trautwein W, Taniguchi J and Noma A: *The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. Pflugers Arch. 392 : 307-314, 1982.*
- 28) Waldman SA and Murad F: *Cyclic GMP synthesis and function. Pharmacol Rev. 39 : 163-196, 1987.*
- 29) Wahler GM, Rusch NJ and Sperelakis N: *8-Bromo-cyclic GMP inhibits the calcium channel current in embryonic chick ventricular myocytes. Can J Physiol pharmacol. 68 : 531-534, 1990.*
- 30) Wrenn RW and Kuo JF: *Cyclic GMP-dependent phosphorylation of an endogenous protein from rat heart. Biochem Biophys Res Commun. 101 : 1274-1280, 1981.*
- 31) Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L and Brown AM: *A G-protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. Science 238 : 1288-1292, 1987.*
- 32) Yatani A, Imoto Y, Codina J, Hamilton SL, Brown AM and Birnbaumer L: *The stimulatory G protein of adenylate cyclase, G_s, also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels. J Biol Chem. 263 : 9887-9895, 1988.*