

K⁺ 통로 조절 약물이 마우스 골격근의 피로현상에 미치는 영향

이기호 · 류판동 · 이문한 · 이항

서울대학교 수의과대학
(1995년 2월 3일 접수)

Effects of potassium channel modulators on the fatigue velocity of mouse skeletal muscle

Ki-ho Lee, Pan-dong Ryu, Mun-han Lee, Hang Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Feb 3, 1995)

Abstract : The density of ATP-sensitive potassium(K_{ATP}) channels, that open as intracellular ATP concentration falls below a critical level, is very high in skeletal muscle surface membrane and those high density may imply that K_{ATP} channels have very important physiological roles. To elucidate a role of K_{ATP} in relation to fatigue, the modulating effects of potassium channel openers and blockers on the fatigue velocity(FV) of mouse extensor hallucis longus muscle(EHL) were investigated in vitro. Twitch contraction was induced by an electrical field stimulation (EFS: 24-48V, 20ms, 0.2-4Hz) and resulting contraction force was isometrically recorded. The twitch forces were gradually decreased to 25% of initial contraction force(ICF) in 37.52±1.55 sec(mean±s.e.m., n=135), indicating the fatigue phenomena. The mean velocity for development of the fatigue was measured during the period that twitch force decreased to half(FV_{0/0.5}) and during the period from half to 25%(FV_{0.5/0.25}) of ICF. The fatigue was induced once every one hour and the tissue response was stable for up to 4 hours.

In control condition, ICF was 5.8±0.12g (n=144) and decreased to 50% of ICF with the mean fatigue velocity of 0.182±0.006g/sec(FV_{0/0.5}, n=135) and from 50% to 25% of ICF with 0.084±0.004g/sec(FV_{0.5/0.25}, n=135). Cromakalim(50μM) significantly increased FV_{0.5/0.25}(n=4). Glibenclamide(IC₅₀>50μM), Ba²⁺(IC₅₀=10μM), 4-aminopyridine(FV_{0/0.5}, IC₅₀=0.5mM; FV_{0.5/0.25}, IC₅₀=2mM) decreased both FV_{0/0.5} and FV_{0.5/0.25} concentration-dependently up to 75%. TEA⁺(30mM), E-4031(10μM), tolbutamide(1mM) decreased FV_{0.5/0.25}, but apamin(300nM) and TEA⁺(10mM) showed no significant effects.

Our results suggest that activation of the K_{ATP} channels may be major cause of K⁺ outflux during development of the fatigue and the isolated EHL muscle could be an useful experimental preparation in studying the fatigue phenomena in skeletal muscle. In addition, the possibility of activation of delayed rectifier during the fatigue development remains to be studied further.

Key words : skeletal muscle fatigue, ATP-sensitive potassium channels, K⁺ channel modulators

서 론

1983년 Noma에 의해 심근세포에서 세포질내 ATP 농도의 변화에 의해 열리고 닫힘이 조절되는 K⁺ channel 즉, ATP-sensitive K⁺ channel(이하 K(ATP)통로)의 존재가 밝혀진 후¹, 쥐장 세포², 여러 종류의 평활근^{3,4,5} 포유류 신경세포의 축삭⁶, 뇌조직⁷, 개구리와 마우스골격근^{8,9,10}에도 존재함이 밝혀졌다.

골격근 세포막에서 K(ATP)통로의 밀도는 10/ μm^2 이상으로 action potential의 재분극에 크게 기여하는 것으로 알려진 delayed rectifier K⁺ channel의 농도보다 더 높아 K(ATP)통로가 골격근의 생리적 조절에 중요한 기능을 담당하고 있을 것이라고 예시하였다⁹. NaCN과 iodoacetate 등의 세포내 대사억제제를 처리한 후 강한 전기자극을 가하면 rigor가 유발된다. 이때 약 5mM 농도로 유지되던 세포내 ATP농도가 80% 정도 감소하며¹¹ K⁺이 세포 밖으로 다량 유출되는데¹² 이러한 K⁺의 유출은 K(ATP)통로를 경유하여 일어나는 것으로 생각되고 있다¹³. 이 결과는 세포내 ATP농도를 낮추기 위하여 ATP생산억제제를 처리한 상태에서 얻어진 것이기 때문에 골격근에서 K(ATP)통로의 생리적 기능을 설명하는데 직접적으로 적용하기는 어렵지만 골격근에서도 K(ATP)통로가 세포내 대사 상태와 세포의 전기적 흥분도 사이에 조절작용을 하고 있음을 알려 준다.

골격근의 피로는 골격근이 수축운동을 반복할 경우 수축력이 감소하는 현상을 말한다¹⁴. 골격근에서의 피로현상은 일반적으로 가역적으로 일어나며 ATP농도의 감소가 예상되는 대표적인 현상이다. 격한 운동중에 혈장 K⁺ 농도가 유의하게 증가하며(in vivo)¹⁵ 적출 골격근에서도 전기적 자극에 의해 유발된 운동시 K⁺이 유출된다는 사실(in vitro)¹⁶이 밝혀졌다. 또한 이러한 K⁺ 농도의 증가가 운동에 관여한 골격근 세포들에서 국소적으로 일어나는 전기적 흥분성의 변화에 의한다는 실험결과^{17,18,19}와 이렇게 증가한 혈장 K⁺양이 운동에 참여한 골격근 세포들로부터 유출된 양만으로도 충분히 설명이 가능하다¹⁵는 계산결과도 발표되었다. 이 사실들은 생리적인 상태에서도 세포내 대사상태의 변화를 골격근 세포의 흥분성 소실로 연결시켜 주는 역할을 하는 K⁺ 통로가 활성화된다는 사실을 짐작할 수 있게 한다. 이러한 결과들을 single channel의 활성을 기록하여 알아낸 K(ATP)통로의 특성들 특히, 세포내 ATP농도가 낮아졌을 때와 H⁺농도가 증가하게 되었을 경우에 활성이 증가한다는 사실과²⁰ lactate가 K(ATP) 통로의 활성을 증가시킨다는 사실²¹들과 연관지어 생각해 볼 때 피

로시에 K(ATP)통로가 활성화되어 K⁺ 유출의 경로로 작용할 수 있음을 짐작할 수 있다.

본 실험에서는 골격근의 피로시 세포내 대사물질들의 평형이 깨어진다는 사실 즉, ATP농도의 감소와 ADP, H⁺, lactate 농도의 상승, 그리고 이러한 환경에서 K(ATP) 통로의 open state probability가 증가한다는 점에 착안하여 피로에 민감한 fast-twitch skeletal muscle인 마우스의 긴엄지뿔발가락뿔근(M extensor hallucis longus, EHL)을 이용하여 골격근의 피로시에 K(ATP)통로가 활성화되어 K⁺ 유출의 주요한 경로로 작용하며, 또 K(ATP) 통로를 통한 K⁺의 유출에 의한 과분극이 수축력 감소의 한 원인일 것이라는 가설을 증명하기 위하여 적출골격근에 전기자극을 가하여 피로를 유발시킨 다음 이렇게 유발된 골격근의 피로유발 속도에 대한 K⁺ 통로 차단제들과 개방제들의 영향을 평가함으로써 피로시 주요하게 활성화되는 K⁺ 통로의 종류를 조사하였다. 본 실험의 일부 결과는 학회에서 이미 발표된 바 있다²².

재료 및 방법

골격근 표본제작 : 실험동물은 (주)유한양행 중앙연구소로부터 3주령의 ICR mouse 암컷을 분양받아 25-35g까지 키워 실험에 이용하였다. 마우스의 후두부를 타격하여 기절시키고 총경동맥을 절단하여 방혈한 후 슬관절 이하 부분을 박피하였다. 육안적으로 관찰되는 결합조직들을 제거한 후 빠른 시간안에 긴엄지뿔발가락뿔근(M extensor hallucis longus, EHL)을 분리하여 sylgard 처리한 용기의 바닥에 핀으로 고정시켰다. 40배 확대 stereoscope하에서 관찰되는 결합조직들을 제거한 후 10×2mm의 종주표본을 만들었다. 제작한 표본의 양끝을 묶는데 원위부의 근육은 노란색, 근위부의 힘줄은 갈색 면사를 사용하여 구분을 용이하게 하였다. 적출한 조직을 20ml용량의 장기수조로 옮겨 원위부는 아크릴로 제작된 조직지지 대에 고정하고 슬관절 쪽의 근위부는 isometric transducer(F-60, Narco Biosystems)에 연결하였다.

전기자극 및 피로유발 : 영양액에 5% CO₂와 95% O₂ 혼합가스를 공급하면서 37°C, 1g의 기본장력하에서 1시간 평형시켰다. 평형기간 동안 매 30분 마다 영양액을 3회 교환하였다. 2개의 백금판 전극사이에 위치한 조직절편에 전기자극기(Gass S6 Model)를 이용하여 최대수축력을 유발하는 자극강도의 1.2배되는 강도(24-48 volts, 20ms duration, 0.2-4Hz)로 전장자극하였다.

전장자극에 의하여 유발되는 수축력을 Physiograph (MK-III, Narco Biosystems)상에서 등척성으로 기록하였다.

첫번째 기록에서는 용매만의 효과를 기록하여 이 값을 control로 정하고 두번째, 세번째기록에서 약물의 효과를 관찰하였다. 용매를 20분간 적용한 후 피로를 유발하기 위한 조건의 전장자극을 가하기 전에 0.2Hz (24-48V, 20ms)의 낮은 빈도로 1분 동안 전장 자극하여 조직이 전장 자극에 대해 일정한 크기의 수축력을 보이도록 적응시킨후 개방제인 경우는 2Hz로, 차단제인 경우는 4Hz로 자극빈도를 높이어 피로를 유발시켰다.

사용약품 및 조제 : 차단제로는 K(ATP)통로 차단제인 glibenclamide(Sigma)와 tolbutamide(Sigma) 그리고 비선택적인 K⁺ 통로 차단제인 TEA⁺(Sigma), BaCl₂(Wako Pure Chemicals) 및 4-aminopyridine(4-AP, Sigma), 심근의 delayed rectifier K⁺ 통로차단제로 알려진 E-4031(Esai), small conductance Ca²⁺-activated K⁺ 통로의 선택적 차단제인 apamin(Sigma)을 썼다. K⁺ 통로 개방제로는 cromakalim(Rhone Poulenc)을 사용하였다. TEA⁺, apamin, BaCl₂는 3차 증류수에, 그외 다른 약물들은 모두 100% DMSO에 녹여 stock solution을 만든 후 각각의 용매로 희석하여 작은 튜브(2ml)에 분주하여 냉동보관하며 실험시 사용하였다. stock solution의 최고농도는 apamin 60μM, BaCl₂ 6mM, 4-AP 0.6mM, cromakalim 20mM, E-4031 2mM, glibenclamide 20mM, tolbutamide 0.2M, TEA⁺ 6M 이었다.

모든 약물들은 20ml 장기수조에 100μl를 가하였을 때 최종농도를 감안하여 stock solution을 만들었으며 약물용매의 부피가 영양액 부피의 1%를 넘지 않게 하였다. 본 실험에서 사용한 Krebs' solution의 조성은 다음과 같다(mM). NaCl 118, KCl 4.75, CaCl₂ 2.54, KH₂PO₄ 1.19, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 11, pH는 7.4이다.

약물처리 방법 : K⁺ 채널 개방제와 차단제는 모두 20분간 적용한 후에 전기 자극을 가하면서 기록을 시작하였다. 초기 수축고의 20%로 감소할 때까지 자극을 계속하며 기록하였다. 한번 기록이 끝나면 자극을 멈추고 3회 세척한 후 1시간 동안 회복을 위하여 다시 평형시켰다. 재평형시키는 기간중에도 30분 간격으로 3회씩 세척하였으며 30분에 수축고가 초기수축고 수준으로 회복되는 것만을 실험에 계속 사용하였으며 그렇지 않은 것들은 기록을 중단하였다. 3번까지는 재현성있게 안정적으로 피로가 유도되었기 때문에 골격근에서 약물의 작용이 가역적인 것으로 알려진 BaCl₂, 4-AP, E-

4031, cromakalim은 2번째기록에서 저농도의 효과를 살피고, 3회 세척후 30분 안정시켰을때 수축고가 초기 수준으로 회복되었을 경우에는 더 높은 농도에서 세번째 기록을 통하여 효과를 살피었다. glibenclamide와 tolbutamide는 골격근에서 작용의 가역성이 완전하지 않기 때문에 두번째에서 단일농도의 효과만을 관찰하고 조직을 버렸다.

결과분석 및 통계 처리 : 피로 유발조건의 자극으로 자극 빈도를 높이기 바로 직전에 기록된 수축력의 크기를 피로 유발속도를 계산하기 위한 초기 수축력(ICF)으로 잡았다. 초기수축력의 1/2 및 1/2에서 1/4로 감소하기 까지의 시간을 FT_{0.5/0.5}와 FT_{0.5/0.25}로 설정하고 (Fig 2), 이 수치를 이용하여 초기감소속도(Fatigue Velocity), FV_{0.5/0.5}와 후기감소속도, FV_{0.5/0.25}를 다음의 공식에 의하여 계산한 다음 비교의 척도로 삼았다.

$$FV_{0.5/0.5}(\text{g/sec}) = (ICF - 0.5ICF) / FT_{0.5/0.5}$$

$$FV_{0.5/0.25}(\text{g/sec}) = (0.5ICF - 0.25ICF) / FT_{0.5/0.25}$$

ICF(Initial Contraction Force, g) : 초기수축고

FT_{0.5/0.5}(Fatigue Time, sec) : 초기수축고가 1/2로 감소하기까지의 시간

FT_{0.5/0.25}(Fatigue Time, sec) : 수축고가 1/2에서 1/4로 감소하기까지의 시간

약물의 효과는 용매인 DMSO나 3차 증류수 100μl만을 전처치하여 얻은 값을 기준으로 하여 차단제인 경우에는 FV_{0.5/0.5}와 FV_{0.5/0.25}가 감소한 부분만을, 개방제인 경우에는 증가한 부분만을 백분율로 환산하여 통계적으로 비교하였다.

각 약물들의 피로유발속도에 대한 영향은 Student's t test를, 피로현상의 재현성 확인은 ANOVA test를 이용하여 유의성있는 차이를 검정하였으며 p<0.05 인 경우에만 group간 평균값에 유의한 차이가 있음을 인정하였다.

결 과

긴엄지뿔발가락퍼짐근(M extensor hallucis longus, EHL) 피로현상의 특성 : 긴엄지뿔발가락퍼짐근(M extensor hallucis longus, EHL)은 fast twitch muscle에 속하며 20ms, 24-48V의 전장자극을 가할 때 순간적으로 수축하고 이완되는 연축(twitch) 반응을 보였다. 이러한 연축은 자극빈도를 1Hz 이상으로 증가시킬때 시간이 지남에 따라 수축력이 감소하는 '피로현상'을 보였으며 (Fig 1), 이 현상은 자극빈도가 높을 수록 일찍 나타났

다(Fig 2A). EHL근의 초기 수축력은 $5.82 \pm 0.12g$ (mean \pm SEM, $n=144$) 이었으며 초기 수축력이 1/2로 줄어들기까지의 시간($FT_{0/0.5}$)은 $16.43 \pm 0.56sec$ ($n=135$), 1/4로 줄어들기까지의 시간($FT_{0/0.25}$)은 $37.52 \pm 1.55sec$ ($n=135$)이었다. '채료 및 방법'에서 기술한 공식에 의하여 피로 유발 평균속도를 계산하여 본 결과 $FV_{0/0.5}$ 는 0.182 ± 0.006 , $FV_{0.5/0.25}$ 는 $0.084 \pm 0.004g/sec$ ($n=135$)로 전장 자극에 의한 EHL의 피로는 초기의 빠른 피로유도기와 후기의 느린 피로 유도기로 구분되는 점을 알 수 있다(Fig 2A).

동일 조직에서 피로유발의 재현성을 알아보기 위한 시간 간격으로 용매만을 적용하면서 세번까지 피로를 유도하여 보았다. 초기피로유발속도, $FV_{0/0.5}$ 는 첫번째, 두번째, 세번째 각각 0.173 ± 0.02 , 0.181 ± 0.02 , $0.180 \pm 0.02g/sec$ ($n=6$)로 group간 평균값의 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p>0.05$). 후기피로유발속도, $FV_{0.5/0.25}$ 는 동일한 순서로 0.083 ± 0.01 , 0.081 ± 0.008 , $0.068 \pm 0.007g/sec$ ($n=6$)로 세번째 피로시 속도가 약간 감소하였지만 통계적으로는 유의성이 없었다($p>0.05$, Fig 2B).

개방제의 효과는 피로유발속도를 증가시킬 것으로 예상되었기 때문에 control을 2Hz에서 기록하였다. 이 조건에서 $FV_{0/0.5}$ 는 0.059 ± 0.009 , $FV_{0.5/0.25}$ 는 $0.024 \pm 0.006g/sec$ ($n=6$)이었는데 4Hz에서의 피로경향과는 달리 피로초기와 피로후기의 피로 유발속도가 달

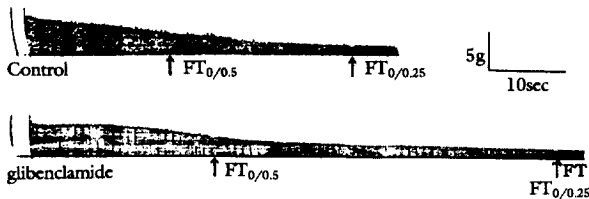


Fig 1. Typical recordings showing the fatigue phenomena(decline of the contraction force with time) and the effects of glibenclamide. Twitch of a fast twitch skeletal muscle, *extensor hallucis longus*(EHL) was induced by electrical field stimulation(20ms duration, 48V, 4Hz). Note that the fatigue times were prolonged by the preincubation with glibenclamide($50\mu M$) for 20min.

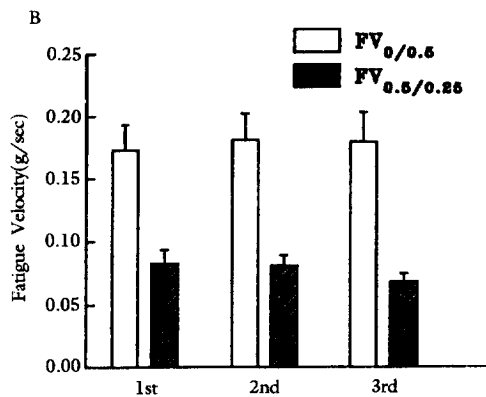
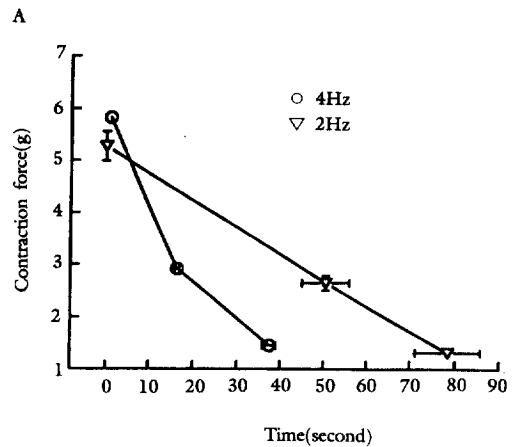


Fig 2. Reproducibility of the skeletal muscle fatigue induced by electrical field stimulation. A. Frequency dependence of the fatigue. The fatigue developed more rapidly at higher frequency. B. Reproducibility of the fatigue induced by the electrical stimulation(20ms, 24-48V, 4Hz) in vitro. The fatigue was induced once every one hour and the tissue response was stable for up to 4 hours. The early and late fatigue velocities, $FV_{0/0.5}$ and $FV_{0.5/0.25}$ were not changed significantly during the period of 3 trials($p>0.05$ from ANOVA test, $n=6$).

라지지 않았다(Fig 2A).

차단제의 작용 : Fig 1의 아래 부분은 glibenclamide (50 μ M)를 전처리한 상태에서 피로를 유발한 경우인데 수축력이 감소되는 속도가 위 부분에 보인 대조실험의 경우보다 지연되고 있음을 알 수 있다. Fig 3은 이러한 일련의 실험 결과를 종합한 것으로 K(ATP)통로의 선택적인 차단제로 알려진 glibenclamide가 전기와 후기의 피로 유발속도, $FV_{0/0.5}$ 와 $FV_{0.5/0.25}$ 모두를 농도 의존적으로 낮추어 피로의 유발을 지연시킴을 알 수 있다 (Fig 1과 Fig 3). 부가적으로 glibenclamide 100 μ M을 20분간 적용하였을 때 초기수축고가 $40.14 \pm 6.25\%$ (n=4) 만큼 감소시키는 효과가 있었기 때문에 100 μ M 이상의 농도에서 얻어진 자료는 분석에 포함시키지 않았다. 여기서 피로유발속도를 반으로 억제하는 glibenclamide의 농도는 50 μ M 이상으로 보인다. tolbutamide는 1mM 농도에서 $FV_{0.5/0.25}$ 는 44.48% 감소시켰지만 $FV_{0/0.5}$ 는 다섯번중 2번은 감소시키고 3번은 반대로 증가시켰다(Table 1).

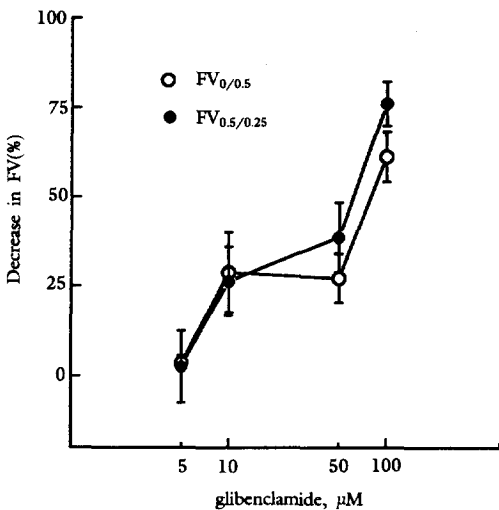


Fig 3. Effect of glibenclamide on the development of the fatigue in mouse EHL muscle. The effect of glibenclamide is expressed as the percentage of the difference in fatigue velocities, $FV_{0/0.5}$ and $FV_{0.5/0.25}$ between the vehicle and glibenclamide treated muscle as described in 'Materials and Methods'. Each point is the mean \pm SEM of more than four observations from separate muscle preparations.

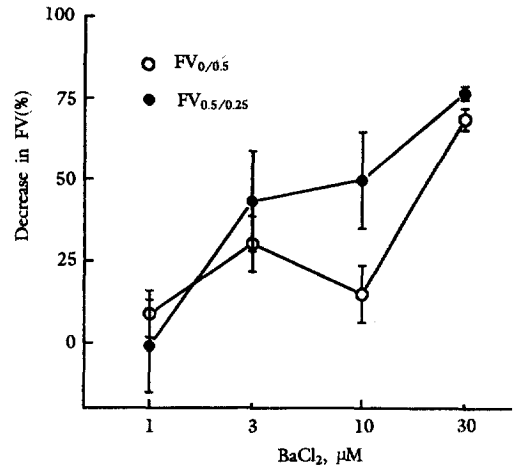


Fig 4. Effect of barium on the fatigue velocity induced by electrical field stimulation(48V, 4Hz, 20ms). The effect of expressed as the percentage of the difference in fatigue velocities, $FV_{0/0.5}$ and $FV_{0.5/0.25}$ between the vehicle and barium treated muscle. Each point is the mean \pm SEM of more than four observations from separate muscle preparations.

$BaCl_2$ 는 비특이적인 K통로 차단제로서 본 실험에서 농도의존적으로 피로 유발속도를 감소시켰으며(Fig 4), IC_{50} 은 10 μ M이었으며, 30 μ M에서 glibenclamide 100 μ M에相当하는 효과를 보였다. 3mM TEA는 피로 유발속도를 $FV_{0/0.5}$ 는 16.97%, $FV_{0.5/0.25}$ 는 14.25% 만큼 증가시켰다. 30mM에서는 피로 유발속도가 $FV_{0/0.5}$ 는 21.52% $FV_{0.5/0.25}$ 는 21.75% 만큼 감소시키는 효과를 보여 농도에 따라 작용에 차이가 있음을 보였다. 4-aminopyridine(4-AP)은 0.3-3mM 사이에서 피로유발 속도를 농도의존적으로 감소시켰다(Fig 5). 4-AP는 초기의 피로유발속도에 대한 억제효과가(IC_{50} =0.5mM) 후기에 대한 억제작용보다 4배 강하게 나타났다 (IC_{50} =2mM). 이는 glibenclamide나 Ba^{2+} 의 작용유형과 구분이 되며, 피로유발 초기에 4-AP에 의해서 억제되는 K통로가 더 많이 활성화 됨을 예시하고 있다. 4-AP는 3mM에서 glibenclamide 100 μ M이나 $BaCl_2$ 30 μ M에相当하는 효과를 보였다. 3mM 이상에서는 초기수축고를 감소시켰으며 0.1mM에서는 예상했던 결과와는 반

Table 1. Effect of K⁺ channel blockers on the fatigue velocity

Drug	Concentration	Effects on the fatigue velocity(%)		N
		FV _{0,0.5}	FV _{0.5,0.25}	
TEA	3mM	16.97±6.1*	14.25±8.15	3
	10mM	8.56±6.45	-1.45±8.26	6
	30mM	-21.52±11.48	-21.75±12.82	4
Apamin	300nM	15.41±20.07	-3.15±6.32	3
E-4031	10μM	35.36±18.37	-32.33±7.79*	3
Tolbutamide	1mM	-6.42±9.19	-44.48±15.59*	5

The increasing(positive) or decreasing effect(negative) on early and late fatigue velocity is expressed as the percentage of the respective control in each experiments. Value are given as mean±standard error of N observations obtained from separate muscle preparations. Values different significantly form zero(p<0.05) as determined by Student's test are indicated by an asterisk.

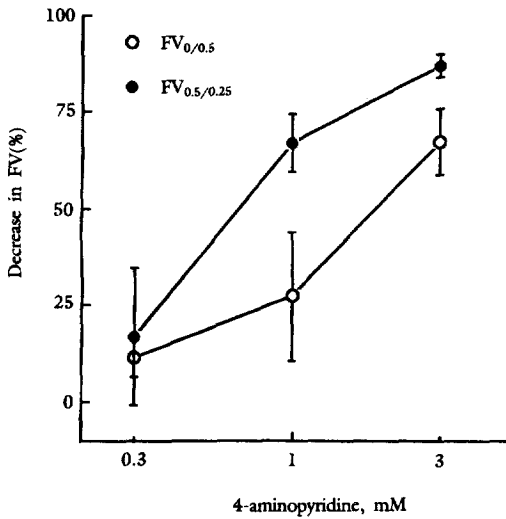


Fig 5. Dose-dependent decreasing effect of 4-aminopyridine(4-AP) on the fatigue velocity. The fatigue was induced by an electrical field stimulation(48V, 4Hz, 20ms). The effect is expressed as percentage of the difference in fatigue velocities, FV_{0,0.05} and FV_{0.5,0.25} between the vehicle and 4-AP treated muscle. Each point is the mean±SEM of more than four observations from separate muscle preparations.

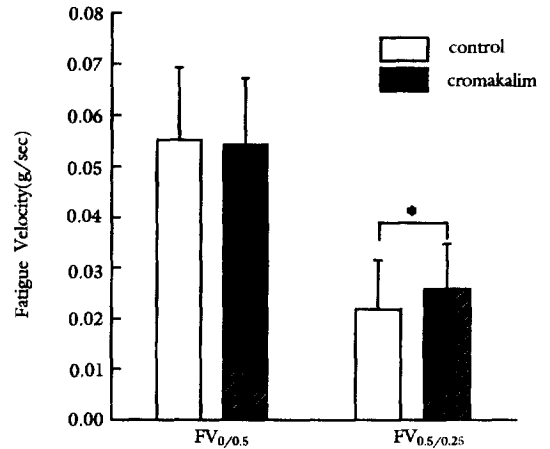


Fig 6. Effect of cromakalim(50μM) on fatigue velocity of a fast twitch skeletal muscle, EHL. The fatigue was induced by electrical field stimulation(20ms, 48V, 2Hz) and cromakalim was applied for 20min before the induction of the fatigue. Vertical lines represent the s.e.m. of 4 separate experiments. Asterisk indicates small, but significant difference(p<0.05) in late fatigue velocity, FV_{0.5,0.25} determined by paired Student's t test.

대로 3번 중에 2번은 피로유발속도를 증가시켰다.

한편, 선택적인 delayed rectifier 차단제인 E-4031은 10 μ M 농도에서 $FV_{0.5/0.25}$ 는 35.36% 만큼 증가시켰으며 $FV_{0.5/0.25}$ 는 32.33% 만큼 감소시켰다. 벌(*Apis mellifera*) 독의 한 성분으로 18개의 아미노산 잔기로 이루어진 peptide²³인 apamin은 Ca^{2+} -activated small-conductance K⁺ channel의 선택적인 차단제로 알려져 있는데 본 실험에서는 300nM에서도 피로유발속도에 유의성있는 영향을 미치지 않았다(Table 1).

개방제 Cromakalim의 작용 : Cromakalim은 대표적인 K(ATP)통로 개방제로서 골격근에서도 cromakalim은 K(ATP) 통로에 특이적으로 작용하며($K_D=220\mu$ M) Ca^{2+} -activated K⁺ channel에는 작용하지 않는 것으로 알려졌다^{24,25}. 본 실험에서 50 μ M cromakalim을 20분간 전처치한 경우 후기의 피로유발속도 ($FV_{0.5/0.25}$)를 작지만 유의성있게 증가시키는 효과를 보였다(Fig 6). 한편 500 μ M의 고농도에서는 초기 수축고를 40%(n=2) 만큼 감소시켰다(자료제시하지 않음).

고 찰

K(ATP)통로는 근육, 신경세포 등에서 ATP농도의 감소에 따른 생리적, 병리적 변화들을 매개하는 것으로 알려져 있다²⁶. 본 실험에서는 골격근의 피로시에 보이는 근육세포로부터의 K⁺ 유출경로를 밝혀보고자 마우스의 EHL을 이용하여 피로현상을 일으키는 모델을 확립한 후 몇가지 K⁺통로 조절약물들의 작용을 평가하여 근육피로 유발에 K(ATP)통로의 활성화가 크게 관여하고 있음을 확인하였다.

EHL이 3번까지 유의한 차이없이 재현성있게 피로의 유도를 보여준 것은 실험에서 피로의 유도를 위하여 적용한 자극조건(20ms duration, 24-48V의 자극강도, 4Hz 자극빈도)이 조직에 필요 이상의 상해를 입히지 않았음을 알려준다. 그러므로 약물들의 피로유발속도에 대한 영향은 반복적인 피로의 유도자체에 의한 조직의 상해나 수축기구들의 이상등의 원인에 의한 것이 아니고 약물의 특이적인 작용에 의한 것임을 알 수 있다.

Delayed rectifier, Ca^{2+} -activated large-conductance K⁺channel (Maxi-K), ATP-sensitive K⁺ channel(K(ATP)통로)을 가역적으로 차단하는 작용이 있는 BaCl₂에 의해 피로유발속도가 농도 의존적으로 감소하였는데 이 사실은 피로시 활성화되는 이온 통로가 K⁺ 통로임을 시사하며 BaCl₂의 효과가 가역적이었던 점으로 미루어 보아 K⁺ 통로에 특이적으로 작용함으로써 유발

된 효과인 것으로 사료된다. 골격근에서 glibenclamide는 A-channel, delayed rectifier, Ca^{2+} -activated K⁺ channel에는 작용하지 않으며²⁷ K(ATP) 통로에 선택적으로 작용한다²⁸. Glibenclamide는 골격근에서 micromole수준의 농도에서 K(ATP)통로에 대한 완전한 차단효과를 보이며 통로의 활성을 50% 감소시키는 농도는 0.19 μ M인 K(ATP)통로의 선택적인 차단제이다²⁴. Cromakalim도 골격근에서 K(ATP)통로에 특이적으로 작용하는 것으로 알려져 있다²⁵. 본 실험에서 glibenclamide에 의해 피로유발속도가 농도의존적으로 감소되었으며 cromakalim에 의해서는 증가되는 효과를 보였다. 이러한 결과는 이들 약물에 의하여 피로시 활성화된 이온통로가 K(ATP)통로일 가능성이 높음을 시사해준다. 반면 전기자극(100V, 2ms duration, 0.1Hz)에 의해 유발된 정상적인 수축운동 동안에 glibenclamide 1 μ M이나 cromakalim 100 μ M은 모두 수축력에 영향을 미치지 않는 것으로 알려졌다²⁹. 즉 이 사실은 피로가 유도되지 않는 안정한 상태에서는 K(ATP)통로가 활성화되지 않는다는 사실을 의미한다. 이러한 사실은 K(ATP)통로가 피로가 유도되지 않는 정도의 운동상태에서는 활성화되지 않다가 피로가 유도되는 상태에서 비로소 활성화되는 특징이 있다는 점을 짐작할 수 있게 한다. glibenclamide가 100 μ M에서 약 40%, cromakalim도 500 μ M에서 약 40% 초기수축고를 감소시킨 것은 이들 약물들이 골격근에서 100 μ M 이상에서는 K(ATP)통로 이외에 또 다른 부위에 작용할 가능성을 시사한다. 4-AP는 delayed rectifier, A-channel, K(ATP)통로에 작용하는 차단제이다. 4-AP의 K(ATP)통로에 대한 작용은 심근에서 0.5mM³⁰, 쥐장 cell에서 2mM²⁸, 골격근에서 0.3-10mM 농도에서 세포안쪽에서 K(ATP)통로의 활성도를 농도의존적으로 감소시키지만 세포 바깥쪽에서는 골격근의 경우 10mM에서도 K(ATP)통로에 대한 작용이 없었다³¹. 그러나 세포질 pH를 증가시켰을 때 세포 밖에서 가해 준 4-AP의 효과가 감소하고 반대로 세포질 pH를 낮추면 4-AP의 효과가 증가한다는 사실은 4-AP가 세포막 안쪽의 pH가 감소하면 cationic form으로 변하여 세포막을 통과할 수 있게 되는 사실을 알려준다³². 본 실험에서 4-AP는 마우스 골격근의 피로유발속도를 농도의존적으로 감소시켰는데 이 결과는 4-AP가 rigor시 K⁺ 유출을 막지 못하였다는 Castle과 Haylett의 보고¹³에 비추어 볼 때 대사 중독상태와 정상상태에서의 피로유발에 미치는 4-AP의 효과는 차이가 있음을 알려주며, 이는 또한 4-AP의 효과가 피로의 초기에 더 크게 나타난 사실을 종합해 보면, 피로의 상태 혹은 피로시 근육세포

내의 대사환경의 변화에 따라 활성화되는 K통로의 종류가 다름을 제시하고 있다.

TEA는 1-100mM농도에서 A type K channel, Ca²⁺-activated large-conductance K⁺ channel(Maxi-K), Ca²⁺-activated small-conductance K⁺ channel(SK channel), K(ATP)등을 비선택적으로 차단하지만 Maxi K에 대한 차단효과가 가장 민감하고 K(ATP)에 대한 작용은 미약한 것으로 알려져 있다²⁷. 골격근에서 단일 K(ATP)에 대한 K_i값은 26mM³³이었다. patch clamp를 이용하여 흰쥐 골격근에서 살펴본 결과 apamin은 100nM에서 SK channel을 완전히 차단하였다³⁴. 본 실험에서 300nM apamin이나 10mM TEA가 피로유발속도에 뚜렷한 영향을 미치지 못한 점은 피로시 활성화되는 K⁺ channel 중에 Ca²⁺-activated K⁺ channel의 관여 가능성이 적음을 알려준다.

부정맥치료제(Class III)로 개발중에 있는 E-4031의 작용에 대하여 골격근에서는 보고된 바 없으나 심근에서는 delayed rectifier를 차단하는 것으로 보고되어 있다³⁵. 본 실험의 결과로부터 E-4031에 민감한 channel이 골격근에도 존재하며 이 통로가 골격근 피로시에 K⁺ 유출의 경로로 작용하고 있음을 알 수 있다.

지금까지 포유류의 골격근 피로시 K⁺의 유출 경로에 대해서는 여러가지 이론적 근거를 바탕으로 설명되고 있었다. 본 실험에서는 K⁺유출 경로로서 K(ATP)통로가 활성화되어 주요하게 역할하고 있음을 실제로 골격근의 피로를 유발하며 실험적으로 증명하였다. 아울러, 마우스 EHL근육조직을 사용하여 재현성있게 피로를 유발시키며 짧은 시간안에 K⁺ 통로에 작용하는 여러 약물들의 효과를 효율적으로 살필 수 있는 조건을 확립하였다. 이 방법은 앞으로 포유류 골격근의 피로현상을 연구하는 데에 유용한 실험모델로도 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

결 론

골격근의 피로는 골격근이 수축운동을 반복할 경우 그 수축력이 감소하는 현상을 말하는데, 피로시 K⁺ 이 다량 유출되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 마우스의 적출 fast-twitch 골격근인 긴엄지뿔발가락피집근(M. extensor hallucis longus, EHL)을 이용하여 피로시 관찰되는 K⁺ 유출의 경로를 밝혀 보고자 전기자극에 의한 피로유발속도에 대하여 K⁺ 통로 차단제들과 개방제가 미치는 영향을 조사하여 비교하였다.

1. 용매(DMSO)만을 처리한 control상태에서 EHL

은 한시간 간격으로 가해진 전자기극(24-48V, 4Hz, 20ms)에 의하여 유발된 피로현상을 피로유발속도에 유의한 변화를 일으키지 않으면서 3번까지 가역적으로 보여 주었다. 초기 수축고(Initial Contraction Force, ICF)는 5.82±0.12g(mean±sem, n=144)이었다. 이때 초기피로유발속도 FV_{0,0.5}와 후기피로유발속도 FV_{0.5,0.25}는 0.182±0.006g/sec(n=135) 및 0.084±0.004g/sec (n=135) 이었다.

2. Glibenclamide(IC₅₀>50μM), BaCl₂(IC₅₀=10μM), 4-aminopyridine(FV_{0,0.5}, IC₅₀=0.5mM; FV_{0.5,0.25}, IC₅₀=2mM)은 농도 의존적으로 피로 유발속도를 감소시켰고(최고 75%까지), K⁺통로 개방제인 cromakalim(50μM)은 피로 유발속도를 증가시켰다.

3. 10mM TEA, 300nM Apamin은 피로유발 속도에 유의한 영향을 주지 않았으며 30mM TEA와 10μM E-4031, 1mM tolbutamide는 FV_{0.5,0.25}를 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과들을 종합하면 K(ATP)통로는 골격근 피로시 활성화되어 K⁺의 주요 유출 경로로 작용하는 것으로 여겨진다. 한편, K(ATP)통로가 아닌 E-4031에 의하여 차단되는 delayed rectifier K⁺ 통로 등의 관여 가능성에 대해서는 더 연구가 되어야 할 것이다. 아울러, 본 연구의 방법은 골격근의 피로현상에 대한 유용한 실험모델로 이용이 될 수 있을 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-148.
2. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984; 311: 271-273.
3. Edwards G, Henshaw M, Miller M, et al. Comparison of the effects of several K⁺ channel openers on rat bladder and rat portal vein *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 679-686.
4. Farray L, Huiziga JD. Potassium channel activation by cromakalim effects the slow wave type action potential of colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257: 35-41.
5. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, et al. Hyperpolarizing vasodilators activates ATP-sensitive K⁺ channels in atrial smooth muscle. *Science* 1989; 245: 177-180.

6. Jonas P, Koh DS, Kampe K, et al. ATP-sensitive and Ca-activated K⁺ channels in vertebrate axons: novel links between metabolism and excitability. *Pflugers Arch* 1991; 418: 68-73.
7. Trussel LD, Jackson MB. Dependence of an adenosine-activated potassium current on GTP-binding protein in mammalian central neurons. *J Neurosci* 1987; 7: 3306-3316.
8. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985; 316: 22
9. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Studies of the unitary properties of Adenosin-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J Physiol* 1987; 382: 213-236.
10. Woll KH, Lonnendonker, Neumcke B. ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: different modes of blockade by internal cations, ATP and tolbutamide. *Pflugers Arch* 1988; 414: 622-628.
11. Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature* 1978; 274: 861-866.
12. Fink R, Luttgau HC. An evaluation of the membrane constants and the potassium conductance in metabolically exhausted muscle fibres. *J Physiol* 1976; 263: 215-238.
13. Castle NA, Haylett DG. Effect of channel blocker on potassium efflux from metabolically exhausted frog skeletal muscle. *J Physiol* 1987; 299: 465-484.
14. Bigland-Ritchie B, Woods JJ. Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle Nerve* 1984; 7: 691-699.
15. Medbo JI, Sejersted OM. Plasma potassium changes with high intensity exercise. *J Physiol* 1990; 421: 105-122.
16. Hirche H, Schumacher E, Hagemann H. Extracellular K⁺ concentration and K⁺ balance of the gastrocnemius muscle of the dog during exercise. *Pflugers Arch* 1980; 387: 231-237.
17. Fenn WO. Factors affecting the loss of potassium from stimulated muscles. *Am J Physiol* 1938; 124: 213-227.
18. Hazeyama Y, Sparks HV. A model of potassium ion efflux during exercise of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1979; 236: R83-90.
19. Hnik P, Holas M, Krekule I, et al. Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrode. *Pflugers Arch* 1976; 362: 85-94.
20. Standen NB. Potassium Channels, Metabolism and Muscle. *Exp Physiol* 1992; 77: 1-25.
21. Keung EC, Li Q. Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1991; 88: 1772-1777.
22. Lee K, Kim HJ, Kim KH, et al. Effects of potassium channel modulators on fatigue time of isolated mouse skeletal muscle. *Kor J Pharmacol* 1993; 29 Suppl: A25.
23. Moczydlowski E, Lucchesi K, Arippa R. An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. *J Membr Biol* 1988; 105: 95-111.
24. Allard B, Lazdunsky M. Pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels in mammalian skeletal muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1993; 236: 419-426.
25. Weik R, Neumcke B. Effects of potassium channel openers on single potassium channels in mouse skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1990; 342: 258-263.
26. Ashcroft FM. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Ann Rev Neurosci* 1988; 11: 97-1182.
27. Cook NS. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Neurosci* 1988; 9: 21-28.
28. Sturgess NC, Ashford MLJ, Cook DL, et al. The sulphonylurea receptor may be the ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* 1985; 8453: 474-475.
29. Grafe P, Quasthoff S, Strupp M, et al. Enhancement of K⁺ conductance improves in vitro the contraction force of skeletal muscle in hypokalemic periodic paralysis. *Muscle Nerve* 1990; 13: 451-457.
30. Kakei M, Noma A, Shibasaki T. Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1985; 363:

441-462.

31. Davies NW, Pettit AI, Agarwal R, et al. The flickery block of ATP-dependent potassium channels of skeletal muscle by internal 4-aminopyridine. *Pflugers Archiv* 1991; 419: 25-31.
32. Howe JR, Ritchie JM. On the active form of 4-aminopyridine: Block of K⁺ currents in rabbit schwann cells. *J Physiol* 1991; 433: 183-205.
33. Davies NW, Spruce AE, Standen NB, et al. Multiple blocking mechanisms of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by tetraethylammonium ions. *J Physiol* 1989; 413: 31-48.
34. Blatz AL, Magleby KL. Single apamine-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 1986; 323: 718-720.
35. Wettwer E, Scholtysik G, Schaad A, et al. Effects of the new class III antiarrhythmic drug E-4031 on myocardial contractility and electrophysiological parameters. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17: 480-487.