

골격근 세포에서 ATP-의존성 K⁺통로의 활성화가 근피로에 미치는
영향

구 현 모, 남기원, 김석범, 이선민
대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공
김 진 상
대구대학교 물리치료학과

The Effects of ATP - sensitive K⁺ Channel on the Muscle
Fatigue in Mouse Skeletal Muscle Cell

Koo, Hyun-Mo, P.T., M.S. Nam, Ki-Won, P.T., M.S., Kim,
Suck-Bum, P.T., Lee, Sun-Min, P.T.

Major in Physical Therapy, Graduate School of Rehabilitation Science, Taegu
University

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

<Abstract>

Excitation-contraction coupling in skeletal muscle is process by which depolarization of the muscle fiber membrane, elicited by a nerve action potential, triggers the release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum(SR). The resulting rise in intracellular Ca²⁺ concentration([Ca²⁺]_i) activates the troponin complex, thereby initiating the contraction of the muscle. The question remains as to what factors are involved in the inhibition of SR Ca²⁺ release in fatigued muscle.

The purpose of this study was determine whether ATP-sensitive K⁺(K_{ATP}) channels are activated and contribute to decrease in [Ca²⁺]_i during fatigue development in the mouse skeletal muscle. To elucidate a role of K_{ATP} in relation to ECC, I measured the modulation effects of K_{ATP} channel blocker(glibenclamide) and opener(pinacidil) on [Ca²⁺]_i after fatiguing electrical field stimulation(FEFS). Intracellular Ca²⁺ signals were recorded by confocal laser microscopy(LSM 410) and monitored using the fluorescent Ca²⁺-sensitive indicator Fluo-3 AM.

The results of this study were as followed:

1. The relative [Ca²⁺]_i after FEFS in the pre-glibenclamide-treated group was higher than the control. And relative [Ca²⁺]_i after FEFS in the pre-pinacidil-treated group was lower than the control.

2. The relative $[Ca^{2+}]_i$ after FEFS for 3 min in the control, pre-glibenclamide-treated group and pre-pinacidil-treated group showed a similar pattern; the gradually significant decrease in $[Ca^{2+}]_i$. But, these decreasing pattern was most significant in the control.

These findings suggest a tight relationship between K_{ATP} and $[Ca^{2+}]_i$ in ECC during fatigue. Therefore, I thought that activation of K_{ATP} channels may be one of mechanisms of the fatigue in skeletal muscle.

I. 서론

골격근의 근수축 과정은 운동신경 말단에서 분비된 아세틸콜린(acetylcholine)에 의해 탈분극이 유발되고 이러한 전기신호는 T-세관계(transverse tubular system)의 전압 감지 분자(voltage-sensor molecule)인 dihydropyridine 수용체(DHP receptor)를 통해 인접한 근장그물(sarcoplasmic reticulum)의 말단 수조(terminal cisternae)에 위치하는 Ca^{2+} 통로인 ryanidine 수용체를 열게 함으로써(Melzer 등, 1995; Rios와 Pizarro, 1991; Susan 등, 2000) 근형질내의 Ca^{2+} 농도가 상승하여 근육 수축 장치를 통해 힘을 발생시키는(Lamb 등, 1995; Blaze와 Lamb, 1999) 흥분-수축 연결과정을 통해 근수축이 유발된다.

골격근이 지속적이고 강한 수축을 하는 동안에는 H^+ , 무기 인산, ATP, ADP와 같은 대사산물의 변화와 근장그물로부터 Ca^{2+} 유리의 변화가 유발되어 근수축력의 감소, 근수축 속도의 감소, 근이완의 지연이 발생된다(Allen 등, 1995). 이로 인해 요구되고 기대하는 힘출력을 유지하지 못하게 되고(Fitts, 1994), 수행능력의 감소를 초래하여 정상적인 활동의 장애를 초래할 수 있다(Allen 등, 1995). 이러한 근피로의 원인 인자는 운동의 강도와 지속시간, 근섬유의 형태, 그리고 개인의 휘트니스(fitness) 정도에 따라 매우 다양하다(Fitts와 Balog, 1996).

ATP-의존성 K^+ 통로는 심장근 세포, 골격근 세포, 평활근 세포(Noma, 1983; Spruce 등, 1985; Standen 등, 1989; Edwards 등, 1991), 신경세포(Ashford 등, 1988), 췌장 β 세포(Cook와 Hales, 1984; Ashford 등, 1988) 등에서 발견되었는데, 골격근의 세포막에서는 이 통로가 일반적으로 활동전압의 재분극에 관여하는 것으로 알려져 있는 delayed rectifier K^+ 통로보다 더 높은 밀도로 존재하고 있는 것으로 밝혀져 골격근의 생리적 기능에 중요한 역할을 하리라는 예측이 가능하다(Spruce 등, 1987).

이 통로는 심장근 혹은 골격근의 허혈, 저산소증, 혹은 대사 억제 동안에 세포내 ATP 농도가 감소(Deutsch 등, 1991; Gramolini 등, 1997; Light 등, 1994)되었을 때, 그리고 ADP(Vivaudou 등, 1991), 젖산(Keung 등, 1991), H^+ (Standen 등, 1992), 아데노신(Barrett-Jolley 등, 1998)이 증가되었을 때 활성화되는 것으로 알려져 있다. ATP-의존성 K^+ 통로가 기능적으로 허혈 혹은 근피로 동안에 근육 세포내의 에너지 수준을 감지하여, 힘의 생산을 감소시킴으로써(Matar, 2000), 에너지 결핍으로 인한 비가역적인 기능 장애에 대항하여 근육을 보호하는 역할을 하는지(Noma, 1983), 아니면 Gasser 등(1990)의 연구에서와 같이 활동전압의 감소와 근수축력의 감소가 심장에서의 부정맥이나 협심증과 같은 병리적인 현상을 초래하는지는 아직 불명확하다. ATP-의존성 K^+ 통로가 열리면 K^+ 전도도가 증가되어 활동전압의 지속시간을 단축시키고(Gasser와 Vaughan-Jones, 1990; Gramolini와

Renaud, 1997), 또한 세포내 K^+ 의 유출이 증가되어 세포 외부의 K^+ 농도를 증가시킴으로써 (Comtois 등, 1994; Gasser 와 Vaughan-Jones, 1990), Na^+ 통로를 불활성화시켜(Adrian 등, 1970) 세포의 흥분성이 떨어지게 된다.

지금까지 근피로와 관련된 다양한 실험들이 이루어져 왔으나 명확한 기전을 제시하고 있지 못하다. 실험에 사용된 표본의 종류나 실험 조건 등에 따라 다양한 결과를 보이고 있고, 또한 상반된 결과를 나타내기도 하기 때문이다.

전기 생리학적 관점에서 볼 때, 지속적인 근육 활동으로 유발된 근피로 후반기에 ATP 완충작용 저하로 인한 세포내 ATP의 농도 감소와 산증을 포함한 대사산물의 축적으로 인해 ATP-의존성 K^+ 통로가 열리게 되고, 이로 인해 막전압이 과분극되어 T-세관계로 전도되는 전기 신호의 전달에 장애를 초래할 것이라는 견해(Westerblad와 Allen, 1993)가 제기되었다.

그래서 본 실험에서는 근피로에 대하여 이해하고자 분리된 생쥐 골격근에 대하여 ATP-의존성 K^+ 통로를 인위적으로 차단 혹은 개방시킬 수 있는 선택적인 약물을 처리하고 근수축을 유도하여 근육 세포내의 Ca^{2+} 농도를 측정함으로써 근피로시 세포내 Ca^{2+} 농도 변화와 ATP-의존성 K^+ 통로 활동의 관련성을 확인하고자 한다. 이를 통해 ATP-의존성 K^+ 통로의 활동이 골격근의 근피로 현상에 관여하는지를 알아보하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 실험동물 및 골격근 표본의 분리

본 실험에는 (주)유한양행 중앙연구소로부터 분양받은 4주령 이상(25~35 g)의 ICR 생쥐를 암수 구분 없이 사용하였다. 먼저 생쥐의 경추를 탈골시켜 희생시킨 후 양측의 슬관절 이하 부분의 피부를 제거한 후 빠른-연축(fast-twitch) 골격근인 장지신근(extensor digitorum longus)을 분리하였다. 이 근육은 흰쥐의 경우 fast-glycolytic(FG) : fast-oxidative(FO) : slow-oxidative (SO)가 60% : 37% : 3% 로 구성되어 있어서 피로에 매우 민감하고(Egginton, 1987), 크기가 작아 약물 침투의 제한이 적은 장점이 있다. 분리한 장지신근은 허혈을 방지하기 위해서 95% O_2 , 5% CO_2 로 조성된 혼합가스로 포화시킨 Krebs solution 내에서 37 °C 조건으로 3분 정도 안정시킨 후에 도립 현미경(SZ-ST, Olympus, Japan)을 통해서 분리과정에서 형태학적으로 손상된 근육표본은 실험에서 제외시켰다.

2. 실험용액 및 약물

본 실험에 사용된 Krebs solution의 조성은 NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, $CaCl_2$ 2.54 mM, KH_2PO_4 1.19 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, glucose 11 mM이며 NaOH를 이용하여 pH 7.4로 적정하여 사용하였다. 그리고 분리된 골격근 표본의 생리적 활성을 돕기 위하여 Krebs solution의 FBS(Fetal bovine serum) 농도를 10%로 유지하였다.

본 실험에서 처리된 약물은 다음과 같다.

세포내 Ca^{2+} 을 관찰하기 위하여 Ca^{2+} indicator인 Fluo-3 AM(Molecular Probes, USA)을 사용하였는데, 유기용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 5 μ M 농도로 골격근 표본에 처리하여 배양시킨 후 Ca^{2+} 농도를 측정하였다.

ATP 의존성 K^+ 통로에 대한 선택적인 작용 약물로서는 차단제(blocker)인 100 μ M glibenclamide(Sigma)와 개방제(opener)인 100 μ M pinacidil(Sigma)을 처리하였다.

3. 약물 처리 및 전장 자극을 통한 근피로 유발

분리된 골격근 표본을 Krebs solution(37 $^{\circ}$ C, 95% O_2 , 5% CO_2)에서 안정시킨 후 대조군, 실험군 I (glibenclamide 처리군), 실험군 II (pinacidil 처리군)으로 나누어 실험을 진행하였다.

4-Well dish(NUNC, Denmark)의 각각의 well에 Krebs solution 900 μ l와 FBS 100 μ l를 채우고 2~3개씩의 분리한 골격근 표본을 넣은 후, 5 μ M Fluo-3 AM을 처리하여 45분간 CO_2 배양기(Forma, USA)에서 loading시켰다. Loading 시작 후 25분 경과한 시점에서 각각의 처리군에 대하여 ATP-의존성 K^+ 통로에 대한 선택적인 약물을 처리하였는데, 대조군에는 유기용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)만을 처리하였고, 실험군 I에는 100 μ M glibenclamide, 실험군 II에는 100 μ M pinacidil을 각각 20분간 전처리하여 전장 자극시에 약물의 효과를 극대화하였다. Fluo-3 AM의 loading을 위한 배양이 끝난 후 새로운 Krebs solution으로 3회 이상 세척하였고, 각각의 처리군은 특정 약물이 처리된 신선한 Krebs solution으로 옮겨 근피로를 유발시키기 위한 전기적 전장 자극(electrical field stimulation)을 가하였다. 근피로 전기자극은 S48 Stimulator(GRASS, USA)를 이용하여 4 Hz, 20 ms, 30 V로 3분간 적용하였다.

4. 세포내 Ca^{2+} 농도의 측정 및 분석

근피로성 전장자극이 끝난 직후 대조군 및 각 실험군의 골격근 표본을 공초점 레이저 현미경(LSM 410, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 excitation laser 488 nm, emission filter BP510~525로 Ca^{2+} 이미지를 주사(scanning)하여 Ca^{2+} 농도를 기록하였다(Fig. 1).

그리고 전기자극 직후의 세포내 Ca^{2+} 농도의 시간적인 변화 양상을 기록하기 위하여 20초 간격으로 3분간 연속적으로 주사(scanning)한 후 Fluoview version 2.0, Microsoft Excel 2000, 그리고 SigmaPlot for Windows version 4.0(SPSS Inc.)을 이용하여 분석 및 도식화하였다. 또한 SPSS version 8.0(SPSS Inc.)을 이용하여 실험 결과에 대한 t-검정을 실시하여, $P < .05$ 인 경우만 유의한 결과로 인정하였다.

III. 결과

1. 전장 자극 전후 골격근 세포내 상대적 Ca^{2+} 농도 측정

대조군 및 각 실험군에 대하여 Ca^{2+} indicator를 처리한 후 특정 약물을 전처리한 상태에서 근피로를 유발시키기 위한 전기적 전장자극을 가한 후에 골격근 세포내의 Ca^{2+} 이미지를 얻었고, 동시에 세포내의 상대적 Ca^{2+} 농도를 기록하였다.

DMSO만을 처리한 대조군의 경우, 골격근 표본에 대하여 전장 자극을 가하기 전의 세포내 Ca^{2+} 농도는 평균 35.21 ± 9.07 을 나타냈으나, 전장 자극 직후에는 세포내 Ca^{2+} 농도가 144.7 ± 20.42 를 나타내어 전장자극 후에 Ca^{2+} 농도가 유의하게 높게 나타났다.

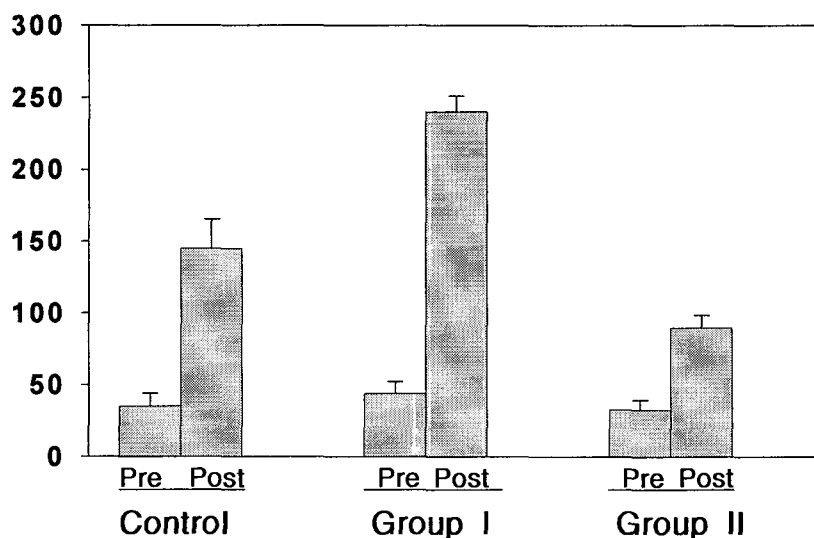
ATP-의존성 K⁺ 통로 차단제(blocker)인 glibenclamide를 처리한 실험군 I에 있어서 전장 자극 전 세포내 상대적 Ca²⁺ 농도는 44.03 ± 8.27로 나타났고, 전장 자극 직후에는 세포내 상대적 Ca²⁺ 농도가 240.18 ± 11.13으로 유의하게 높게 나타났다.

그리고, ATP-의존성 K⁺ 통로 개방제(opener)인 pinacidil을 처리한 실험군 II에 있어서는 전장 자극 전 세포내 Ca²⁺ 농도가 32.64 ± 6.92였으나 전장 자극 직후에는 89.69 ± 9.12로 유의한 증가를 보였다.

실험군의 전장 자극 전 세포내 Ca²⁺ 농도를 대조군과 비교 분석한 결과 glibenclamide를 처리한 실험군 I은 대조군에 비하여 유의하게 높은 수치를 나타냈고, pinacidil을 처리한 실험군 II는 대조군에 비하여 낮은 세포내 Ca²⁺ 농도를 보였다. 그리고 각각의 실험군에 대하여 전장 자극 직후에 나타난 세포내 상대적 Ca²⁺ 농도를 대조군과 비교 분석한 결과 또한 glibenclamide를 처리한 실험군 I은 대조군 보다 높은 세포내 Ca²⁺ 농도를 나타냈고, pinacidil을 처리한 실험군 II는 대조군에 비하여 낮은 세포내 Ca²⁺ 농도를 보였으며, 이러한 차이는 유의성을 나타냈다(Fig. 1)(Table 1).

<Table 1> Relative [Ca²⁺]_i before(Pre) and after(Post) fatiguing electrical field stimulation

	Pre - FEFS		Post - FEFS	
	Mean (N)	SD	Mean (N)	SD
Control	35.21 (31)	9.07	144.7 (9)	20.42
Group I	44.03 (6)	8.27	240.18 (13)	11.13
Group II	32.64 (12)	6.92	89.69 (8)	9.12

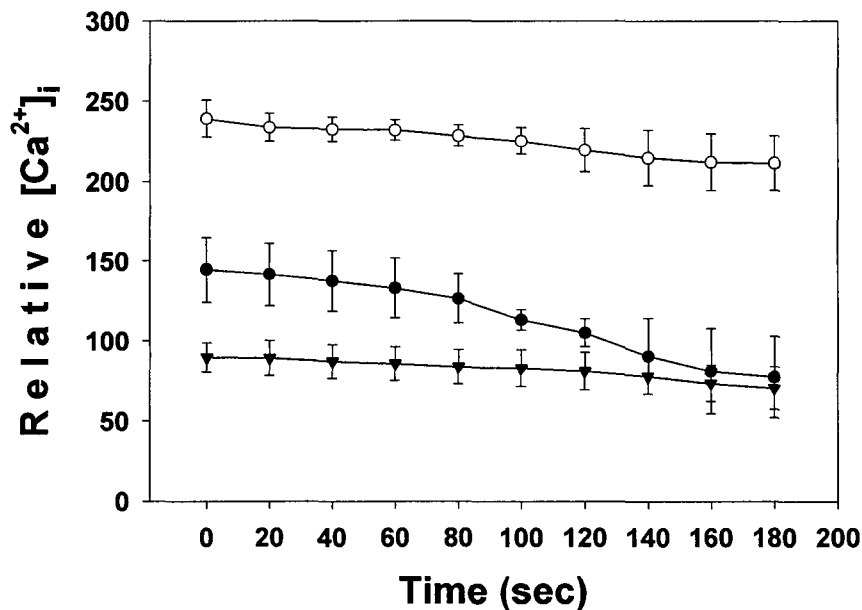


<Fig. 1> Relative [Ca²⁺]_i before(Pre) and after(Post) fatiguing electrical field stimulation(* : p<.05)

2. 전장 자극 후 골격근 세포내의 시간적 Ca^{2+} 농도 변화

대조군 및 각 실험군에 대하여 Ca^{2+} indicator를 처리한 후 특정 약물을 전처리한 상태에서 골격근 세포내 Ca^{2+} 농도의 시간적인 변화 양상을 기록하기 위하여 근피로를 유발시키기 위한 전기적 전장자극을 가한 직후부터 20초 간격으로 3분간 세포내 Ca^{2+} 농도를 기록 분석하였다.

골격근 표본들에 대하여 전장 자극 직후부터 기록한 세포내 Ca^{2+} 농도는 대조군 및 실험군 모두에서 점차적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2). 즉, 전장 자극 직후 및 3분 경과 후의 세포내 Ca^{2+} 농도가 대조군(n=9)에서는 144.70 ± 20.42 , 77.67 ± 25.22 로 나타났고, 실험군 I (n=13)에서는 239.48 ± 11.32 , 211.68 ± 17.00 였으며, 실험군 II (n = 8)에서는 89.69 ± 9.13 , 70.77 ± 13.18 로서 모든 표본들에서 전장자극 직후에 비하여 3분 경과 후에는 세포내 Ca^{2+} 농도의 유의한 감소 현상을 나타냈다(Fig. 2).



<Fig. 2> Relative $[Ca^{2+}]_i$ after fatiguing electrical field stimulation for 3 min in the control, group I, and group II.

IV. 고찰

지속적이거나 반복적인 활동 이후에는 골격근의 장력이 감소하게 되는데, 이러한 근피로 현상은 신체적인 활동들에 대한 근본적인 제한점들 중의 하나이다.

골격근 근수축에 있어서, 수축성 단백질들의 활성화는 근장 그물로부터 근형질내로 Ca^{2+}

이 유리되어 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가함으로써 이루어진다. 근수축이 반복됨에 따라서 힘(force)의 생산 능력이 점차적으로 감소하는데, 이러한 근피로는 신경지배보다는 오히려 근육세포 내부의 변화로부터 기인되는 것으로 생각되고 있다(Bigland-Ritchie 등, 1983; Duchateau와 Hainaut, 1985; Vøllestad 등, 1988). 근피로의 세포 내부적 기전들을 규명하고자 여러 연구들이 이루어져 왔으나, 세포내의 다양한 부위에 대하여 여러 원인 인자들이 복합적으로 관여하고 있기 때문에 이에 대한 명확한 기전을 제시하기에는 여러 가지 어려움이 있다. 이러한 제한점들이 존재함에도 불구하고 현재까지 근피로 과정을 이해하는데 있어서 많은 진전이 이루어졌다(Fitts, 1994).

근피로에 대한 가능성 있는 가설 중의 하나는 피로가 유발된 근육의 수축시에는 수축성 단백질을 충분히 활성화시킬 수 있을 정도의 Ca^{2+} 농도를 유지할 수 없다는 가설이다(Allen 등, 1989; Eberstein과 Sandow, 1963; Lee 등, 1991, Westerblad와 Allen, 1991; Allen 등, 1995; Fitts, 1994). 이러한 제안은 단일 근섬유에서 aequorin이나 fura-2와 같은 Ca^{2+} -sensitive probe들을 이용하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 측정 한 실험을 통해서 근피로 현상의 중요한 원인인자가 근장 그물로부터의 Ca^{2+} 유리 장애와 밀접한 관련이 있음을 확인함으로써 설득력을 얻게 되었다(Allen 등, 1989; Lee 등, 1991; Westerblad와 Allen, 1991; Eberstein과 Sandow, 1963; Grabowski 등, 1972; Lännergren과 Westerblad, 1989).

또 하나의 가설로서 근피로시의 세포내부 환경의 변화들이 수축성 단백질들을 억제한다는 견해가 제시되었다(Chase와 Kushmerick, 1988; Cooke 등, 1988; Dawson 등, 1978; Godt와 Nosek, 1989; Miller 등, 1988; Wilson 등, 1988). 이러한 제안은 *in vivo*(Dawson 등, 1978; Miller 등, 1988) 및 *in vitro*(Chase와 Kushmerick, 1988; Cooke 등, 1988) 실험을 통해서 근피로 상황에서 세포내 환경의 점진적인 변화와 힘의 감소 사이의 밀접한 관련성이 확인됨으로써 지지되고 있다.

이러한 Ca^{2+} 유리 감소 현상이 어떠한 경로를 거치는지 밝혀지지 않았는데, Dawson 등(1980)은 대사작용과 Ca^{2+} 유리를 관련짓는 가능성 있는 부위로서 ATP가 요구되는 근장 그물의 Ca^{2+} 펌프를 제시하였다. 그리고 Smith 등(1985)과 Rousseau 등(1988)은 근장 그물의 Ca^{2+} 유리 통로들의 장애 원인을 아데노신 뉴클레오티드의 농도 변화로 설명하였다. 또한 Ma 등(1988)은 pH 감소를 세포내 Ca^{2+} 유리 장애의 직접적인 원인으로 제시한 반면에 Bruton 등(1998)과 Chin 등(1998)은 세포내 산중과는 관련성이 없다는 실험결과를 제시하였다.

여러 선행 연구 결과들(Grabowski 등, 1972; Allen 등, 1989; Jones 등, 1979)에서 보여지는 바와 같이 세포내 Ca^{2+} 농도는 근수축력과 밀접한 관련성을 가지고 있고, 근피로의 원인 기전에서 중요한 요소라는 사실은 의심의 여지가 없다.

골격근의 근피로 조건에서 실제적으로 많은 양의 K^+ 의 유출이 발생한다는 사실은 이미 실험적으로 밝혀져 있고(Lucier와 Mainwood, 1972; Hink 등, 1976; Hirsche 등, 1980, Sjøgaard 등, 1985), 유출된 K^+ 이 근형질막과 T-세관막에 축적되어 흥분수축과정의 장애와 힘생산의 장애를 발생시킨다는 주장이 여러 연구를 통해 제기된 바 있다(Sjøgaard 등, 1985; Sjøgaard, 1990, 1991; Renaud와 Light, 1992).

그래서 본 연구에서는 골격근 형질막에 고밀도로 존재하는 것으로 알려진(Spurce 등, 1985) ATP-의존성 K^+ 통로가 근피로가 유발된 조건에서 활성화되어 근수축시의 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 관여하는지를 확인하여 근피로에서의 ATP- 의존성 K^+ 통로의 기능적인 역할을 이해하고자 하였다. ATP-의존성 K^+ 통로의 중요한 활성화 조건이 ATP 감소

(Noma, 1983) 및 pH 저하(Davies, 1990) 등이므로 이러한 조건은 근피로시의 세포내부 환경 변화와도 부합된다.

단일 이온 통로를 연구하는 대표적인 실험 방법으로 Patch-clamp 기법(Hamil 등, 1981; Weik와 Neumcke, 1989; Michel 등, 1991)이 있으나, 골격근의 근피로 현상과 관련하여 단일 근육세포로부터 ATP-의존성 K^+ 통로의 활동을 기록하는데 있어서는 몇 가지 제한점이 존재한다. 즉, 골격근의 피로를 유발시키기 위하여 근수축을 유발시킬 경우 patch pipette과 근섬유 세포막 사이의 gigaohm seal이 손상되어 단일 이온 통로 기록이 불가능하고, inside-out patch를 형성하게 되면 세포내 구획이 상실된다. 그리고 patch clamp 조건 하에서는 ATP-의존성 K^+ 통로를 활성화시키기 위하여 세포내 ATP 농도를 μM 수준으로 유지하여야 하지만, 생체 내의 세포내 ATP 농도는 강한 운동 동안에도 mM로 유지되므로 생리학적인 조건의 차이가 존재한다(Spurce 등, 1987). 그래서 본 실험에서는 fluorescent Ca^{2+} -sensitive indicator를 처리하여 세포내 Ca^{2+} 에 loading시키는 실험방법(Westerblad 등, 1990)을 이용하였다.

세포내 Ca^{2+} 농도를 측정하기 위한 실험 표본 모델은 단일 근섬유를 이용한 방법(Andrade 등, 1998; Westerblad 등, 1990), 단일 근육 분리 방법(Baker 등, 1993), 표면막(surfae membrane)을 기계적으로 제거한 skinned fiber를 사용하는 방법(Lamb과 Stephanson, 1990; Larsson과 Salniati, 1992), 그리고 균질화시키거나 분리한 근장그물(sarcolpasmic reticulum) 표본을 사용하는 방법(Favero 등, 1993; Ward 등, 1998) 등이 있다. 본 연구에 사용한 단일 근육 분리 방법은 실험적으로 분리가 용이하고, 분리 과정에서의 손상을 최소화 할 수 있는 장점이 있다.

그리고 본 연구에서 근피로를 유발하기 위하여 적용한 전장자극의 유해성 여부를 검증하고자 골격근 표본에 대하여 전장자극과 안정을 교대로 3회 반복 적용하였을 때에도 유의한 수축성의 감소를 나타내지 않았으므로 전장자극이 비가역적인 손상을 초래하지 않음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 나타난 실험 결과들은 근피로시에 ATP-의존성 K^+ 통로가 골격근 세포내의 전기적 신호전달의 장애를 초래하여 Ca^{2+} 의 세포내 유리를 직접적으로 감소시킬 수 있으리라는 연구자의 생각과 일치하였다. 본 실험에서 대조군과 실험군 I, 그리고 실험군 II에서 근피로성 전장자극 직후에 세포내 Ca^{2+} 농도가 유의하게 증가하였는데, 전장자극 직후의 세포내 Ca^{2+} 농도가 전장자극 전에 비하여 유의하게 상승한 점은 세 군에서 동일하지만, 실험군 I은 대조군에 비하여 전장자극 직후에 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가 정도가 유의하게 높은 수치를 보인 반면에 실험군 II는 대조군에 비하여 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가 정도가 유의하게 낮은 수치를 나타내었다. 즉, ATP-의존성 K^+ 통로를 차단하였을 경우에는 흥분-수축 연결과정의 K^+ 의 유출이 감소하므로 활동전압의 지속기간 단축이 발생하지 않아 전장자극 직후의 세포내 Ca^{2+} 농도가 높게 나타나게 되고, ATP-의존성 K^+ 통로를 개방시켰을 경우에는 이와 반대 현상이 일어난 것으로 생각할 수 있다.

본 연구에서 전장자극을 통하여 수동적으로 근피로를 유발시킨 것과 달리 Terence 등(1993)이 흰쥐를 트레드밀(21m/min)에서 달리도록 하는 능동적 운동을 적용하여 근피로를 유도한 실험에서도 Ca^{2+} 유리 통로 기능의 직접적인 변화로 인해 세포내로의 Ca^{2+} 유리가 감소하리라는 견해를 제시하였다. Westerblad와 Allen(1991)의 연구에서도 포유류의 단일 근섬유를 이용하여 근피로 후기의 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소와 근장력(tension)의 감소 사이의 관련성이 실험적으로 증명되었다. 그리고 Grafe 등(1990)에 의하면 정상적인 수축 활동을

위한 전기자극 동안에는 glibenclamide를 처리하여 ATP-의존성 K^+ 통로를 차단하여도 수축력에 영향을 미치지 않는다고 하였는데, 이를 통해 피로가 유발되지 않은 조건에서는 ATP-의존성 K^+ 통로가 활동하지 않고 피로 조건에서 활성화됨을 알 수 있다. 또한 Light(1994) 등의 연구에서는 ATP-의존성 K^+ 통로의 활성화가 근피로 동안에 힘을 감소시키는지에 대한 구체적인 증거를 얻지는 못하였지만, glibenclamide가 근피로 이후의 수축력 회복에 장애를 유발한다는 결과를 얻음으로써 ATP-의존성 K^+ 통로의 활동이 근피로의 회복에 관여할 것이라고 제안하였다.

전장 자극 직후에 증가된 세포내 Ca^{2+} 농도의 시간적인 변화양상을 기록한 결과 대조군, 실험군 I, 실험군 II에서 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 감소 현상은 근형질 내로 유리되었던 Ca^{2+} 이 점차 회수되는 과정으로 생각되는데, 특히 ATP-의존성 K^+ 통로를 인위적으로 통제하지 않은 대조군에서 현저하였다. 따라서 근피로시에 ATP-의존성 K^+ 통로가 활성화 혹은 억제되면 피로의 회복 과정에서도 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다. 그리고 대조군 및 실험군 I, 실험군 II에서 세포내 Ca^{2+} 의 회수가 진행되는 것으로 보아 본 실험에서 근피로를 유도하기 위하여 적용한 전장자극이 골격근 표본의 비가역적인 손상을 유발하지 않았음을 유추할 수 있었다.

본 연구에서는 근피로의 원인 인자로서 ATP-의존성 K^+ 통로 활동과 세포내 Ca^{2+} 농도와 의 관련성에 초점을 두어 실험을 진행하였는데, 부가적으로 근육 형태(type)에 따른 ATP-의존성 K^+ 통로의 생리학적 역할을 확인하고 다른 세포내 대사산물들과의 상호관련성도 밝혀야 할 것이다.

VI. 결론

본 연구에서는 골격근의 피로현상을 전기생리학적 측면에서 이해하고자 전장자극을 통한 피로 유발성 근수축시에 ATP-의존성 K^+ 통로의 활동이 세포내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향을 실험을 통해 확인하였다. 실험은 유기용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)만을 처리한 대조군, ATP-의존성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide를 처리한 실험군 I, ATP-의존성 K^+ 통로 개방제인 pinacidil을 처리한 실험군 II로 나누어 근피로성 전장자극에 따른 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화를 측정하였으며 다음의 결론을 얻었다.

1. 대조군, 실험군 I, 실험군 II의 세포내 Ca^{2+} 농도는 근피로성 전장자극 전에 비하여 근피로성 전장자극 후에 모두 유의하게 높은 수치를 나타냈다.

그러나 근피로성 전장자극 직후 세포내 Ca^{2+} 농도의 각 구간 비교에서는 유의한 차이를 나타냈다. 실험군 I은 DMSO만을 처리한 대조군에 비하여 유의하게 높은 세포내 Ca^{2+} 농도를 나타냈고, 실험군 II는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 세포내 Ca^{2+} 농도를 나타냈다.

2. 대조군, 실험군 I, 그리고 실험군 II에서 근피로성 전장자극 이후의 증가된 세포내 Ca^{2+} 농도가 시간 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소 경향은 대조군에서 가장 현저하였고, 실험군 I, 실험군 II 순으로 나타났다.

이러한 결과들을 통해 ATP-의존성 K^+ 통로의 활동이 골격근 세포내의 Ca^{2+} 유리에 영향을 미칠 수 있고, 전장자극 이후의 Ca^{2+} 회수 과정을 지연시키는 것으로 생각된다.

결론적으로, ATP-의존성 K^+ 통로는 골격근의 근피로 조건에서 활성화되어 흥분-수축 연결과정의 가역적인 장애를 초래함으로써 근형질내 Ca^{2+} 농도에 영향을 미치는 것으로 생

각할 수 있다.

<참고문헌>

Adrian, R. H., W. K. Chandler, & A. L. Hodgkin. (1970) Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. *Journal of Physiology(Lond)* 208, 607-644.

Allen D. G., J. Lännergren, & H. Westerblad (1995) Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Experimental Physiology* 80, 497-527.

Allen D. G., J. Lännergren, & H. Westerblad (1997) The role of ATP in the regulation of intracellular Ca^{2+} release in single fibres of mouse skeletal muscle. *Journal of Physiology* 498(3), 587-600.

Allen D. G., Lee J. A., & Westerblad H. (1989) Intracellular calcium and tension during fatigue in isolated single muscle fibres from *Xenopus laevis*. *Journal of Physiology* 415, 433-458.

Andrade F. H., Reid M. B., Allen D. G., & Westerblad H. (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibers from the mouse. *Journal of Physiology(Lond)* 509, 565-575.

Ashford, M. L. J., Sturgess, N. C., Trout, N. J., Gardner, N. J., & Hales, C. N. (1988) Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pfugers Archiv* 412, 297-304.

Baker A. J., Longuemare M. C., Brandes R., & Weiner M. W. (1993) Intracellular tetanic calcium signals are reduced in fatigue of whole skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 264, C577-C582.

Barrett-Jolley, R., A. Comtois, N. W. Davies, P. R. & Stanfield, N. B. Standen. (1996) Effect of adenosine and intracellular GTP on K_{ATP} channels of mammalian skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology* 152, 111-116.

Bigland-Ritchie B., Kukulka C. G., Lippold O. C. J., & Woods J. J. (1983) The absence of neuromuscular transmission failure in sustained maximal voluntary contractions. *Journal of Physiology(Lond)* 330, 265-278.

Blazev R., & Lamb G. D. (1999) Adenosine inhibits depolarization-induced Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *Muscle Nerve* 22, 1674-1683.

Bruton J. D., Lännergren J., & Westerblad H. (1998) Effects of CO_2 -induced acidification on the fatigue resistance of single mouse fibers at 28°C. *Journal of Applied Physiology* 85, 478-483.

Chase P. B., & Kushmerick M. J. (1988) Effects of pH on contraction of rabbit fast and slow muscle fibers. *Biophysical Journal*. 53, 935-946.

Chin E. R., & Allen D. G. (1998) The contribution of pH-dependent single muscle

fibres. *Journal of Physiology* 512, 831-840.

Comtois A., Sinderby C., Comtois N., Grassino A., & Renaud J-M. (1994) An ATP-sensitive potassium channel blocker decreases diaphragmatic circulation in anaesthetised dogs. *Journal of Applied Physiology* 77, 127-134.

Cook D. L., & Hales C. N. (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311, 271-273.

Cooke R., Franks K., Luciani G. B., & Pate E. (1988) The inhibition of rabbit skeletal muscle contraction by hydrogen ions and phosphate. *Journal of Physiology(Lond)* 395, 77-97.

Davies N. W. (1990) Modulation of ATP-sensitive K^+ channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature* 343, 375-377.

Dawson M. J., Gadian D. G., & Wilkie D. R. (1978) Muscle fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature* 274, 861-866.

Dawson M. J., Gadian D. G., & Wilkie D. R. (1980) Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Journal of Physiology* 299, 465-484.

Deutsch N., Klitzner T. S., Lamp S. T., & Weis J. N. (1991) Activation of cardiac ATP-sensitive K^+ current during hypoxia : correlation with tissue ATP level. *American Journal of Physiology. Heart Circ. Physiol.* 261, H671-H676.

Duchateau J., & Hainaut K. (1985) Electrical and mechanical failures during sustained and intermittent contractions in humans. *Journal of Applied Physiology.* 58, 942-947.

Eberstein A., & Sandow A. (1963) Fatigue mechanisms in muscle fibres. In: Gutmann E., Hink P.(eds) The effect of use and disuse on neuromuscular functions. *Elsevier*, Amsterdam, pp 516-526.

Edwards, G., Henshaw, M., Miller, M., & Weston, A. H. (1991) Comparison of the effects of several K^+ channel openers on rat bladder and rat portal vein in vitro. *Br. J. Pharmacology* 102, 679-686.

Egginton, S. (1987) Effects of an anaerobic hormone on striated muscle growth and performance. *Pflügers Archiv* 410, 349-355.

Favero T. G., Pessah I. N., & Klug G. A. (1993) Prolonged exercise reduces Ca^{2+} release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archiv* 422, 472-475.

Fitts R. H. (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiological reviews* 74, 49-94.

Fitts R. H. & Balog E. M. (1996) Effect of intracellular and extracellular ion changes on E-C coupling and skeletal muscle fatigue. *Acta Physiologica Scandinavica* 56, 169-181.

Gasser, R. N. A., & Vaughan-Jones, R. D. (1990) Mechanism of K^+ efflux and action potential shortening during ischemia in isolated mammalian cardiac muscle. *Journal of Physiology* 431, 713-741.

Godt R. E., & Nosek T.M. (1989) Changes of intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle. *Journal of Physiology* 412, 155-180.

Grabowski W., Lobsiger E. A., & Luttgau H. C. (1972) The effect of repetitive stimulation at low frequencies upon the electrical and mechanical activity of single muscle fibres. *Pflügers Archiv* 334, 222-239.

Gramolini, A., & Renaud, J. M. (1997) Blocking ATP-sensitive K^+ channel during metabolic inhibition impairs muscle contractility. *American Journal of Physiology (Cell Physiology)* 272, C936-C946.

Grafe P., Quasthoff S., Strupp M., & Lehmann-Horn F. (1990) Enhancement of K^+ conductance improves in vitro the contraction force of skeletal muscle in hypokalemic periodic paralysis. *Muscle Nerve* 13, 451-457.

Hamil, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391(2), 85-100.

Hirche H., Schumaker E. & Hagemann H. (1980) Extracellular K^+ concentration and K^+ balance of the gastrocnemius muscle of the dog during exercise. *Pflügers Archiv* 387, 231-237.

Hnik P., Holas M., Krekule I., Kriz N., Mejsnar J., Smiesko V., Ujec E. & Vyskocyl F. (1976) Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrodes. *Pflügers Archiv* 362, 85-94.

Jones D. A., Bigland-Ritchie B., & Edwards R. T. H. (1979) Excitation frequency and muscle fatigue: mechanical responses during voluntary and stimulated contractions. *Exp Neurol* 64, 401-413.

Keung, E. C., & Q. Li. (1991) Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* 88, 1772-1777.

Lännergren J., & Westerblad H. (1989) Maximum tension and force-velocity properties of fatigued, single *Xenopus* muscle fibres studied by caffeine and high K^+ . *Journal of Physiology* 409, 473-490.

Lamb G. D., Junankar P. R., & Stephenson D. G. (1995) Raised intracellular $[Ca^{2+}]$ abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *Journal of Physiology* 489.2, 349-362.

Lamb G. D., & Stephenson D. G. (1990) Calcium release in skinned muscle fibers of

the toad by transverse tubule depolarization or by direct stimulation. *Journal of Physiology(Lond)* 423, 495-517.

Larsson L., & Salviati G. (1992) A technique for studies of the contractile apparatus in single human muscle fibre segments obtained by percutaneous biopsy. *Acta Physiol Scand* 146, 485-495.

Lee J. A., Westerblad H., & Allen D. G. (1991) Changes in tetanic and resting $[Ca^{2+}]_i$ during fatigue and recovery of single muscle fibers from *Xenopus laevis*. *Journal of Physiology(Lond)* 433, 307-326.

Light P. E., Comtois A. S., & Renaud J. M. (1994) The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K^+ channel activation during fatigue. *Journal of Physiology* 475, 495-507.

Lucier G. E., & Mainwood G. W. (1972) The measurement of potassium efflux in superfused frog sartorius muscles. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 50, 123-131.

Ma J., Fill M., Kundson C. M., & Campbell K. P. (1988) Ryanodine receptor of skeletal muscle is gap junction type channel. *Science* 242, 99-102.

Martar W., Nosek T. M., Wong D., & Renaud J. M. (2000) Pinacidil suppress contractility and preserves energy but glibenclamide has no effect during muscle fatigue. *American Journal of Physiology. Cell Physiol.* 278, C404-C416.

Melzer W., Herrmann-Frank A., Lüttgau HCh (1995) The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim BioPhys Acta* 1241, 59-116.

Michel B. Vivaudou, Christophe Arnoult, & Michel Villaz (1991) Skeletal muscle ATP-sensitive K^+ channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers: ATP Inhibition is recorded by magnesium and ADP. *Journal of Membrane Biology* 122, 165-175.

Miller R. G., Boska M. D., Moussavi R. S., Carson P. J., & Weiner M. W. (1988) ^{31}P Nuclear magnetic resonance studies of high energy phosphates and pH in human muscle. *J. Clin. Invest.* 81, 1190-1196.

Noma, A. (1983) ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147-148.

Rios E., & Pizarro G. (1991) Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Review* 71, 849-908.

Renaud J. M., & Light P. E. (1992) The effects of K^+ on the twitch and tetanic contraction in the sartorius muscle of the frog. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 70, 1236-1246.

Rousseau E., La Dine, Liu Q-Y, & Meissner G. (1988) Activation of the calcium

release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys* 267, 75-86.

Sjøggard G. (1990) Exercise-induced muscle fatigue : the significance of potassium. *Acta Physiologica Scandinavica* 140(suppl. 593), 1-64.

Sjøggard G. (1991) Role of exercise-induced potassium fluxes underlying muscle fatigue: A brief review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69. 238-245.

Sjøggard G., Adams R. P., & Saltin B. (1985) Water and ion shifts in skeletal muscle of humans with intense dynamic knee extension. *American Journal of Physiology* 248, R190-196.

Smith J. S., Coronado R., & Meissner G. (1985) Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature* 316, 446-449.

Spruce A. E., Standen, N. B., & Stanfield P. R. (1985) Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316, 22.

Spruce A. E., Standen, N. B., & Stanfield P. R. (1987) Studies of the unitary properties of Adenosin-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *Journal of Physiology* 382, 213-236.

Standen, N. B., A. I. Pettit, N. W. Davies, & P. R. Stanfield. (1989) Activation of ATP-dependent K⁺ currents in intact skeletal muscle fibres by reduced intracellular pH. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 247, 195-198.

Terence G. F., Isaac N. P., & Gray A. K. (1993) Prolonged exercise reduces Ca²⁺ release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archiv* 422, 472-475.

Vivaudou, M. B., C. Arnoult, & M. Villaz. (1991) ATP-sensitive K⁺ channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers: ATP inhibition is reduced by magnesium and ADP. *Journal of Membrane Biology* 122, 165-175.

Vøllestad N. K., Sejersted O. M., Bahr R., Wood J. J., & Bigland-Ritchie (1988) Motor drive and metabolic responses during repeated submaximal contractions in humans. *Journal of Applied Physiology* 64, 1421-1427.

Ward C. W., Spangenberg E. E., Diss L. M., & Williams J. H. (1998) Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum calcium uptake and release rates. *American Journal of Physiology* 275, R99-R104.

Weik R., & Neumcke B. (1989) ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: characterization of the ATP-binding site. *Journal of Membrane Biology* 110, 217-226.

Westerblad H., & Allen D. G. (1991) Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *Journal of General*

Physiology 98, 615-635.

Westerblad H., & Allen D. G. (1993) The contribution of $[Ca^{2+}]_i$ to the slowing of relaxation in fatigued single fibres from mouse skeletal muscle. *Journal of Physiology* 468, 729-740.

Westerblad H., Lee J. A., Lamb A. G., Bolsover S. R., & Allen D. G. (1990) Spatial gradients of intracellular calcium in skeletal muscle during fatigue. *Pflügers Archiv* 415, 734-740.

Wilson J. R., McCully K. K., Mancini D. M., Boden B., & Chance B. (1988) Relationship of muscular fatigue to pH and diprotonated P_i in humans: a ^{31}P -NMR study. *Journal of Applied Physiology* 64, 2333-2339.