

Chrysosplenol C가 분리한 백서 심실 근세포 Ca²⁺ Transient에 미치는 효과

정석한 · 두 디 두 후웅* · 트란 반 성* · 뉘엔 만 쿙** · 김영호 · 우선희#

충남대학교 약학대학, 의약품개발연구소, *베트남과학기술원 화학연구소, **베트남과학기술원 천연물화학연구소

(Received March 23, 2011; Accepted April 11, 2011)

Effects of Chrysosplenol C on Intracellular Ca²⁺ Transient in Isolated Rat Ventricular Myocytes

Suk-Han Jung, Do Thi Thu Huong*, Tran Van Sung*, Nguyen Manh Cuong**, Young-Ho Kim and Sun-Hee Woo#

College of Pharmacy, IDRD, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam

**Department of Bioactive Products, Institute of Chemistry, VAST, Hanoi, Vietnam

Abstract — Chrysosplenol C [5,6-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dimethoxychromen-4-one] is a flavonoid found in *Milium balansae* and *Pterocaulon sphacelatum*. We have recently shown that chrysosplenol C has positive inotropic effect in isolated rat ventricular myocytes. In the present study, we explored a possible mechanism for the positive inotropic effect of chrysosplenol C by examining intracellular Ca²⁺ transients during action potentials. The intracellular Ca²⁺ transients were measured by confocal Ca²⁺ imaging in field-stimulated single rat ventricular myocytes. Chrysosplenol C (50 μM) significantly increased the magnitudes ($\Delta F/F_0$) of Ca²⁺ transients (control, 1.08±0.05; chrysosplenol C, 1.25±0.03; n=8, P<0.01). Half decay time of the action potential-induced Ca²⁺ transient was not altered by chrysosplenol C (50 μM) (control, 154±6 ms; chrysosplenol C, 167±11 ms; n=21). The Ca²⁺ content in the sarcoplasmic reticulum (SR), measured as caffeine (10 mM)-induced Ca²⁺ transient, was significantly decreased by chrysosplenol C (50 μM). These results indicate that chrysosplenol C increases Ca²⁺ transients without altering Ca²⁺ removal kinetics in ventricular myocytes, providing a possible mechanism for its positive inotropic effect.

Keywords □ chrysosplenol C, intercellular Ca²⁺ transient, ventricular myocytes, SR Ca²⁺ content, Ca²⁺ transient decay

Chrysosplenol C[5,6-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dimethoxychromen-4-one]는 *Milium balansae*(Annonaceae)¹⁾와 *Pterocaulon sphacelatum*(Asteraceae)²⁾에서 추출되는 플라보노이드이다. Chrysosplenol C는 4'-hydroxy-3-methoxyflavone 물질로 poliovirus, rhinovirus의 복제과정을 저해하는 것으로 알려져 있으며,^{2,3)} KB 및 Hep-G2 암 세포주에서 독성을 나타내는 것으로 보고된 적이 있다.⁴⁾ 최근 본 연구그룹에서 최초로 이 물질이 심실근세포의 수축력을 가역적으로 증가시킨다는 사실을 보고 한 바 있다(EC₅₀가 약 45 μM).⁵⁾ 또한 이 물질은 수축 속도를 약간 증가 시키나, 이완 속도는 변화시키지 않는 것으로 나타났다.⁵⁾ Chrysosplenol C에 의한 양성 변력 효과(positive inotropic effect)는 베타 아드레날린 수용체나 protein kinase A를 억제하

였을 때에도 나타나기 때문에⁵⁾ 이들 신호전달 과정과 상관이 없을 것으로 생각되고 있다. 이 물질의 양성 변력 효과에 대한 기전은 아직까지 모호한 상태이다.

심근세포의 수축과 이완은 활동전위 시 발생하는 세포 내의 일시적인 Ca²⁺ 농도의 증가와 감소(Ca²⁺ transient)에 의한다. Ca²⁺ 농도의 증가는 탈분극 시 세포 막 L-형 Ca²⁺ 통로를 통해 세포 내로 유입되는 소량의 Ca²⁺이 근소포체(sarcoplasmic reticulum) 막에 있는 라이아노딘(ryanodine) 수용체 Ca²⁺ 유리 통로를 활성화 시켜 근소포체로부터 폭발적으로 Ca²⁺을 유리시켜 발생한다.⁶⁻¹⁴⁾ 증가한 세포질 Ca²⁺은 수축을 유도하고, 대부분 다시 근소포체 내부로 Ca²⁺ pump에 의해 흡수(uptake)되며, 일부는 Na⁺-Ca²⁺ 교환체에 의해 세포 밖으로 나가게 된다.^{15,16)} 이로써 근육은 이완되게 된다.^{15,16)}

이 논문에서는 chrysosplenol C에 의한 양성 변력 효과의 세포 기전을 알아내고자 분리한 심실근세포의 Ca²⁺ transient에 대한 이 물질의 효과를 고찰하였다. Ca²⁺ transient는 전기 자극을

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5924 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) shwoo@cnu.ac.kr

가한 흰쥐 심실근세포에서 공초점 Ca^{2+} 영상화 기법을 이용하여 정량하였다.

실험방법

단일 심실 근세포의 분리

심실 근세포의 분리는 Woo 등¹¹⁾의 방법으로 시행했다. 백서 수컷(Sprague Dawley, 체중 200~250 g)을 펜토바르비탈(sodium pentobarbital, 150 mg/kg, 복강투여)로 마취시킨 후 흉강을 열어 심장을 적출했다. 심장 적출 수술에 관련된 제반 절차는 충남대학교 동물관리윤리위원회의 심의를 통과하였다. 적출된 심장의 대동맥을 랑겐도르프 장치의 cannular에 매단 후 대동맥을 통해 36.5°C의 0 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액(0.137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$, 10 glucose, pH=7.3)을 3분간 관류시켰다. 그 후 collagenase A(1.4 mg/ml, Type 1; Roche, Indianapolis, IN, USA)와 protease(0.14 mg/ml, Type XIV; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 포함한 0 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액을 12 분간 관류시키고, 마지막으로 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액을 8분 동안 관류시켰다. 심장에서 심실을 취하여 여러 조각으로 나눈 후, 조각들을 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에서 흔들여 심실세포들이 떨어져 나오도록 하였다. 분리된 세포들은 실온의 0.2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액에서 보관되었다.

공초점 Ca^{2+} 영상화(imaging) 및 영상 분석

영상화 실험에는 60배 oil-immersion 대물렌즈(Plan Apo, 개구수 1.4, Nikon, Japan)가 장착된 도립현미경(Ti, Nikon, Japan)이 연결된 레이저 스캔 공초점 현미경(A1, Nikon, Japan)을 사용했다. Ca^{2+} 형광을 나타내게 하기 위해 단일 심실 근세포를 Ca^{2+} 특이적 염색약인 fluo-4 AM(4 M, Invitrogen, Eugene, OR, USA)으로 30분 동안 실온에서 염색시켰다. Fluo-4 AM은 488 nm 파장의 레이저(Melles Griot Laser, USA)를 통해 들뜸(excitation) 상태로 되었으며 여기(emission) 형광은 510 nm 이상의 파장에서 측정되었다. 염색 시약은 2 mM $[Ca^{2+}]$ -Tyrode 용액을 10분 동안 흘려주어 다시 제거하였다. 세포의 탈분극을 유도하여 활동전위를 일으키기 위해 백금 전극을 사용하여 1 Hz의 빈도로 전기 자극을 가하였다(Stimulator I, Hugo Sachs Elektronik, Germany). 이차원 영상을 60 Hz로 NIS Elements AR(version 3.1, Nikon, Japan) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 기록하였으며, 동일 프로그램을 이용하여 단일 세포 영상의 Ca^{2+} 형광 강도(F)를 시간에 따라 정량하였다. 정상 tyrode 용액에서 이완 말기의 F 값을 F_0 라 하였고, Ca^{2+} 농도는 F/F_0 로 표시하였다.¹¹⁾

Chrysofenol C의 분리

Chrysofenol C의 분리는 Huong 등¹⁾의 방법을 이용했다. *M.*

*balansae*의 건조된 토엽(ground leaves)과 가지들(2.3 kg)을 실온에서 MeOH- H_2O (95:5)로 추출했다. 용매를 증발시켜 200 g의 MeOH 추출물을 얻었다. 이 중 160 g을 물에 재용해 시키고 EtOAc와 n-BuOH를 이용한 액체 분획법(liquid-liquid partitioning)으로 110 g의 EtOAc와 40 g의 n-BuOH 추출물을 얻었다. EtOAc 추출물은 실리카겔(230~400체)이 충전된 관 크로마토그래피에 극성을 증가시키는 용매 혼합물(n-hexane, EtOAc, MeOH)을 이용하여 열 개의 분획으로 분리되었다. 이 중 여섯 번째 분획(3 g)이 CH_2Cl_2 -MeOH로부터 결정화되었고, 여기서 2.5 g의 chrysofenol C를 얻었다.

Chrysofenol C(4',5,6-trihydroxy-3,3',7-trimethoxy-flavone): EI-MS m/z 360 $[M]^+$. 1H -NMR(DMSO- d_6 , 500 MHz), δ : 12.35 (1H, s, OH-5), 9.89(1H, s, OH-4), 8.70(1H, s, OH-6), 7.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 7.62(1H, dd, $J=8.4$ and 2.0 Hz, H-6'), 6.96(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.89(1H, s, H-8), 3.91(3H, s, OMe-7), 3.87(3H, s, OMe-3'), 3.81(3H, OMe-3). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 Hz), δ : 178.1(C-4), 155.5(C-2), 154.5(C-7), 149.7(C-4'), 148.8(C-9), 147.5(C-3'), 145.6(C-5), 137.6(C-3), 129.6(C-6), 122.6(C-6'), 121.0(C-1'), 115.6(C-5'), 112.0(C-2'), 105.5(C-10), 91.0(C-8), 59.7(OMe-3), 56.3(OMe-7), 55.8 (OMe-3').

통계 분석

실험 데이터의 수치들은 평균 \pm 표준오차(standard error of mean, SEM)로 요약되었고, 통계학적인 비교는 "t-test"로 이루어졌다. *P* 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단되었다.

실험결과 및 고찰

Ca^{2+} 지시약으로 loading 된 분리한 심실근세포를 세포 챔버에 안착한 후 2 mM Ca^{2+} 이 포함된 tyrode 용액으로 계속 superfusion 시켰다. 1 Hz의 전기 자극을 세포에 계속 가하며, 공초점 현미경으로 세포 내 Ca^{2+} 형광 신호의 변화를 영상화 하였고, 기록된 영상으로부터 형광강도를 정량하여 시간에 대한 Ca^{2+} 변화의 그래프를 Fig. 1A와 같이 얻었다(자세한 설명은 실험 방법을 참조). Fig. 1A는 약물을 처리하기 전 정상 tyrode 용액에서 기록된 Ca^{2+} transient("a")와 chrysofenol C(50 M)를 흘려준 후 그 약물 효과가 안정된 시점(3분 후)에 동일한 세포에서 얻은 대표 Ca^{2+} transient("b")를 보여주고 있는데, chrysofenol C에 의하여 Ca^{2+} transient가 증가함을 알 수 있다. 여러 심실근 세포에서 탈분극에 의해 유도된 Ca^{2+} transient들의 크기($\Delta F/F_0$)는 chrysofenol C 처리 전과 후에서 각각 1.08 ± 0.05 , 1.25 ± 0.03 ($n=8$)이었으며, chrysofenol C 처리 후에 현저히 컸다(Fig.

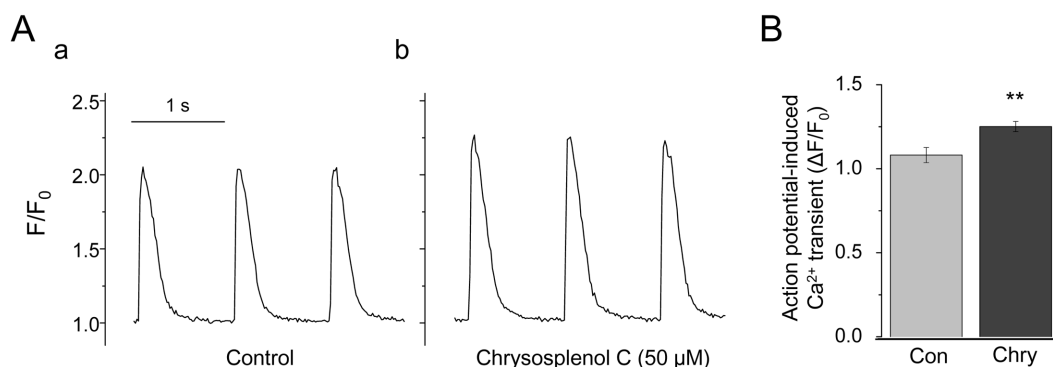


Fig. 1 – Enhancement of intracellular Ca^{2+} transients by chryso splenol C in rat ventricular myocytes. (A) Representative action potential-induced Ca^{2+} transient traces recorded in a single rat ventricular myocyte before (a, control) and 3-min after the treatment of 50 μM chryso splenol C (b). (B) Comparison of mean magnitudes of Ca^{2+} transients (F/F_0) between control (Con; 1.08 ± 0.05) and chryso splenol C (50 μM) (Chry; 1.25 ± 0.03 , $n=8$). Action potential-induced Ca^{2+} transients were significantly increased by chryso splenol C ($P < 0.01$ vs Con).

1B; $P < 0.01$). 이완기 Ca^{2+} 농도(F/F_0)는 약간 증가하였다 (control, 1; chryso splenol C, 1.03 ± 0.01 ; $n=8$, $P < 0.05$). 이 결과는 활동 전위 시 근소포체로부터 Ca^{2+} 의 유리량이 증가하였음을 나타낸다. 또한 이전에 보고된 chryso splenol C에 의한 양성 변력 효과는 이 물질이 세포내 Ca^{2+} transient 크기를 증가시킴으로써 일어남을 알 수 있다. 이러한 chryso splenol C에 의한 수축력 증가의 기전은 기존에 알려진 강심제를 중 디기탈리스나 아드레날린의 심근 수축 증가 기전과 유사하다.^{17,18)}

Chryso splenol C는 수축력의 속도를 약간 가속화하나 이완속도에는 영향을 미치지 않는다.⁵⁾ 이러한 현상은 베타 아드레날린 수용체 자극 시 나타나는 이완속도의 증가와는 차이가 있다. 베타 아드레날린 수용체 자극은 근소포체의 Ca^{2+} pump를 활성화시키고, 이로써 Ca^{2+} transient의 decay를 가속화시켜 이완을 보다 빠르게 한다. Chryso splenol C가 Ca^{2+} transient의 decay 속도에 영향을 미치지 알아보기 위해 Ca^{2+} transient가 50% 감소할 때 까지 걸리는 시간(: Half-decay time)을 고찰하였다.

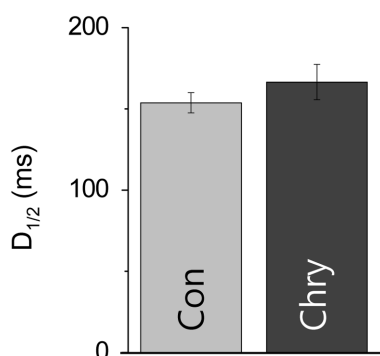


Fig. 2 – No effect of chryso splenol C on the Ca^{2+} transient decay in rat ventricular myocytes. Comparison of decay of action potential-induced Ca^{2+} transient ($D_{1/2}$, half decay time) between control (154 ± 6 ms) and 50 μM chryso splenol C (167 ± 11 ms) ($n=8$).

Chryso splenol C를 처리하기 전과 후에 측정된 half-decay time은 유사하였다(Fig. 2). 이 결과로 미루어, chryso splenol C가 Ca^{2+} 의 제거 기전에(예, 근소포체 Ca^{2+} pump, Na^+ - Ca^{2+} exchanger) 영향이 없을 것으로 생각된다.

다음 실험에서는 chryso splenol C가 근소포체 내의 Ca^{2+} 저장량에 영향을 미치는지 조사하였다. 근소포체 내의 Ca^{2+} 저장량은 고농도의 카페인(cafeine)을 처리하여 발생하는 세포질 Ca^{2+} transient의 크기로 측정되었다. 고농도의 카페인은 근소포체 라이아노딘 수용체를 모두 활성화시켜 대부분의 Ca^{2+} 을 세포질로 유리시킨다고 알려져 있어서 근소포체 Ca^{2+} 저장량의 측정정에 사용되어 왔다.¹⁹⁾ 카페인을 처리하기 전, 세포에 1 Hz로 활동전위를 10회 이상 일으켜 일정한 Ca^{2+} transient가 나타남을 확인 하였다. 카페인으로 유도된 Ca^{2+} transient의 크기는 약물이 없을 때보다 약물을 처리한 후에 감소되었다(control, 2.53 ± 0.12 , $n=19$; chryso splenol C, 1.81 ± 0.20 , $n=21$, $P < 0.01$). Ca^{2+} 저장량이 줄어든 것은 라이아노딘 수용체를 통한 Ca^{2+} 유리량이 증가한 것(Fig. 1)과 관련이 있을 것이다. Ca^{2+} transient의 decay 속도가 변화되지 않았기 때문에(Fig. 2), Ca^{2+} 저장량의 감소가 근소포체 Ca^{2+} pump 활성의 감소에 의한 것은 아닐 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 분리한 백서 심실근세포에서 활동전위에 의해 유발된 세포 내 Ca^{2+} transient의 크기가 chryso splenol C에 의하여 증가됨을 보여주었으며, 이 결과는 이전에 보고되었던 chryso splenol C에 의한 양성 변력 효과⁵⁾를 설명해 줄 수 있는 하나의 세포 기전이 될 것으로 사료된다. 이 논문에서는 또한 chryso splenol C에 의한 Ca^{2+} transient 크기의 증가가 근소포체 Ca^{2+} 저장량의 변화에 의해 발생하는 것이 아님을 보여주고 있다.

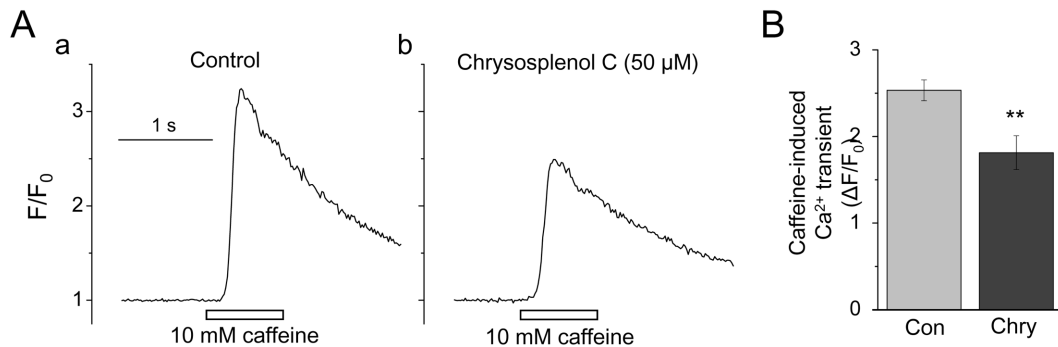


Fig. 3 – Reduction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content by chrysosplenol C in rat ventricular myocytes. (A) Caffeine (10 mM)-induced Ca²⁺ transients recorded in a representative myocyte in the absence (a, control) and presence (b) of 50 μM chrysosplenol C. (B) Comparison of the mean magnitude (ΔF/F₀) of caffeine-induced Ca²⁺ transient between control (n=19) and chrysosplenol C (n= 21, **P<0.01 vs Con).

감사의 말씀

이 연구는 2010년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

참고문헌

- Huong, D. T., Kamperdick, C. and Sung, T. V. : Homogentisic acid derivatives from *Miliusa balansae*. *J. Nat. Prod.* **67**, 445 (2004).
- Semple, S. J., Nobbs, S. F., Pyke, S. M., Reynolds, G. D. and Flower, R. L. : Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. *J. Ethnopharmacol.* **68**, 283 (1999).
- Tsuchiya, Y., Shimizu, M., Hiyama, Y., Otoh, K., Hashimoto, Y., Nakayama, M., Horie, T. and Morita, N. : Antiviral activity of natural occurring flavonoids *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3881 (1985).
- Huong, D. T., Luong, D. T., Thao, T. T. and Sung, T. V. : A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Miliusa balansae* (Annonaceae). *Pharmazie.* **60**, 627 (2005).
- Son, M. J., Kim, H. K., Huong, D. T., Kim, Y. H., Sung, T. V., Cuong, N. M. and Woo, S. H. : Chrysosplenol C increases contraction in rat ventricular myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**(2), 269 (2011).
- Verheijck, E. E., Wilders, R., Joyner, R. W., Golod, D. A., Kumar, R., Jongasma, H. J., Bouman, L. N. and van Ginneken, A. C. : Pacemaker synchronization of electrically coupled rabbit sinoatrial node cells. *J. Gen. Physiol.* **111**, 95 (1998).
- Kim, J. C., Son, M. J., Subedi, K. P., Li, Y., Ahn, J. R. and Woo, S. H. : Atrial Local Ca²⁺ signaling and inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **103**, 59 (2010).
- Adachi-Akahane, S., Cleemann, L. and Morad, M. : Cross-signaling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine

receptors in rat ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **108**, 435 (1996).

- Woo, S. H., Soldatov, N. M. and Morad, M. : Modulation of Ca²⁺ signaling in rat atrial myocytes : possible role of the alpha1C carboxyl terminal. *J. Physiol.* **552**, 437 (2003).
- Sham, J. S., Hatem, S. N. and Morad, M. : Functional coupling of Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 121 (1995).
- Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Ca²⁺ current-gated focal and local Ca²⁺ release in rat atrial myocytes : evidence from rapid 2-D confocal imaging. *J. Physiol.* **543**, 439 (2002).
- Nbauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. : Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* **244**, 800 (1989).
- Fabiato, A. : 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 (1985).
- Sandow, A. : Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.* **25**, 176 (1952).
- Bassani, R. A., Bassani, J. W. and Bers, D. M. : Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* **453**, 591 (1992).
- Guo, A. and Yang, H.T. : Ca²⁺ removal mechanisms in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **297**, C732 (2009).
- Endoh, M. : Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathological relevance. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 73 (2004).
- Endoh, M. : Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 525 (2006).
- Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Diversity of atrial local Ca²⁺ signalling : evidence from 2-D confocal imaging in Ca²⁺ buffered rat atrial myocytes. *J. Physiol.* **567**, 905 (2005).