

Murrayafoline-A에 의한 심실 근육세포 Ca^{2+} 스파크 발생의 증가

김준철 · 뉘엔 만 쿙* · 우선희#

충남대학교 약학대학, *베트남 과학기술원 천연물 화학 연구소

(Received July 9, 2014; Revised August 3, 2014; Accepted August 18, 2014)

Enhancement of Ca^{2+} Spark Occurrence by Murrayafoline-A in Rat Ventricular Myocytes

Joon-Chul Kim, Nguyen Manh Cuong* and Sun-Hee Woo#

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

*Institute of Natural Products Chemistry, VAST, Hanoi, Vietnam

Abstract — Murrayafoline-A (1-methoxy-3-methylcarbazole) is a monomeric carbazole alkaloid found in *Murraya euchrestifolia* HAYATA and *Glycosmis stenocarpa*. We have recently shown that murrayafoline-A has positive inotropic effect in isolated rat ventricular myocytes. To know possible mechanisms for the positive inotropic effect of murrayafoline-A we examined the effects of murrayafoline-A on *in situ* behavior of cardiac Ca^{2+} release units (' Ca^{2+} sparks') and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} loading using confocal Ca^{2+} imaging method in single rat ventricular myocytes. Murrayafoline-A significantly increased the frequency (events/ $10^3 \mu m^2 \cdot s$) of Ca^{2+} sparks in a concentration-dependent manner, with an EC_{50} of $28 \pm 6.4 \mu M$ and a maximal ~twofold change. The Ca^{2+} content in the SR, measured as caffeine (10 mM)-induced Ca^{2+} transient, was significantly increased by murrayafoline-A ($\approx 116\%$ and $\approx 123\%$ of control at 25 and 100 μM , respectively). In addition, murrayafoline-A significantly increased the fractional Ca^{2+} release, suggesting increase in the efficacy of Ca^{2+} release at given SR Ca^{2+} loading. These results suggest that murrayafoline-A may enhance contractility via increase in Ca^{2+} release from the SR through the ryanodine receptors in ventricular myocytes.

Keywords □ murrayafoline-A, Ca^{2+} spark, ventricular myocytes, SR Ca^{2+} content, fractional Ca^{2+} release

Murrayafoline-A (Mu-A : 1-methoxy-3-methylcarbazole)는 *Murraya euchrestifolia* HAYATA와 *Glycosmis stenocarpa* 같은 몇 개의 운향과(Rutaceae) 식물에서 발견되는 monomeric carbazole 알칼로이드로 알려져 있다.^{1,2)} Murrayafoline-A은 장시간(15~17시간) 처리했을 때, 인간 섬유 육종 세포와 대장암 세포 등 몇몇 암 세포들에서 성장 억제 효과가 있다고 알려져 있으며($IC_{50}=118.5 \mu M$),^{3,4)} 생쥐 tsFT210 세포에서 아포토시스(apoptosis) 유도 효과가 있다고 보고된 바 있다.³⁾ 또한, murrayafoline-A가 다른 암 세포주들에 비해 MOLT-4(leukemia)와 HOP-18(nonsmall cell lung cancer) 세포들에서 선택적 세포 독성을 나타낸다는 보고도 있다.⁵⁾ 최근 이 물질이 심실 근육 세

포의 수축력을 증가시켰음을 본 연구 그룹이 처음으로 보고하였다.⁶⁾

포유류 심장 근세포의 수축은 흥분-수축 연결(excitation-contraction coupling, E-C coupling)이라는 일련의 과정에 의해 조절 받는다. 이 과정 동안, 탈분극 시 L-type Ca^{2+} 전류(I_{Ca})에 의한 Ca^{2+} 유입으로 라이아노딘 수용체들(ryanodine receptors; RyRs)이 활성화되어 많은 양의 Ca^{2+} 이 근소포체(sarcoplasmic reticulum, SR)로부터 세포질로 유리되어 수축이 발생된다.⁷⁻⁹⁾ 라이아노딘 수용체들은 SR 막에 집단으로 존재하며 같이 개폐되는 특징이 있으며, 각 그룹의 라이아노딘 수용체들로부터 유리되는 Ca^{2+} 을 ' Ca^{2+} 스파크'라고 한다.¹⁰⁾ 이 Ca^{2+} 스파크는 심근 세포에서 Ca^{2+} 증가의 기본 단위로 생각되고 있다.¹⁰⁾ 근소포체 내부의 Ca^{2+} 은 이 라이아노딘 수용체의 활성화에 직접 영향을 준다고 알려져 왔고, 또 근소포체 내외 세포질(cytosol) 사이의 Ca^{2+} 경사도를 조절함으로써 Ca^{2+} 스파크 발생 빈도를 조절한다고 생각되고 있다.^{11,12)}

이 논문에서는 murrayafoline-A에 의한 양성 변력 효과의 세포 기전을 알아내고자, 분리한 심실근세포에서 이 물질이 라이

#Corresponding Author

Sun-Hee Woo

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

Tel.: 042-821-5924 Fax.: 042-823-6566

E-mail: shwoo@cnu.ac.kr

아노딘 수용체의 세포 활성화(Ca^{2+} 스파크)와 근소포체 내 Ca^{2+} 저장량에 영향을 미치는지 고찰하였다.

실험방법

단일 심실 근세포의 분리

심실 근세포의 분리는 Woo *et al.*¹³⁾의 방법으로 시행하였다. 간단히 요약하면, 백서 수컷(Sprague Dawley, 체중 200~300 g)을 sodium pentobarbital(150 mg/kg, 복강 투여)로 마취한 후 심장을 적출하였다. 심장 적출 수술에 관련된 제반 절차는 충남대학교 동물관리윤리위원회의 심의를 통과하였다. 심장의 대동맥을 랑겐도르프(Langendorff) 관류 장치의 cannular에 연결하여 고정된 후, 대동맥 안으로 0 mM [Ca^{2+}]-Tyrode 용액((단위 : mM) 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 10 glucose, pH=7.3)을 36.5°C에서 3분간 관류시켰다. 그 후 0 mM [Ca^{2+}]-Tyrode 용액에 collagenase A(1.4 mg/ml, Roche)와 protease (0.14 mg/ml, Type XIV, Sigma)를 포함한 용액을 12분간 관류시키고, 마지막으로 0.2 mM [Ca^{2+}]을 포함한 Tyrode 용액을 8분간 관류시켜 사용된 효소를 제거하였다. 심장을 랑겐도르프 장치에서 분리한 후 심실을 취하여, 여러 조각으로 나눈 후, 조각을 흔들어서 세포들이 떨어져 나오도록 하였다. 분리한 세포는 실험에 사용하기 전까지 실온에서 0.2 mM [Ca^{2+}]을 포함한 Tyrode 용액에 보관하였다.

이차원 공초점 Ca^{2+} 영상화

영상화 실험에는 60배 oil-immersion 대물렌즈(Plan Apo, 개구수 1.4, Nikon, 일본)가 장착된 도립현미경(Ti, Nikon)이 연결된 레이저 스캔 공초점 현미경(A1, Nikon)을 사용했다. Ca^{2+} 형광을 나타내게 하기 위해 단일 심실 근세포를 Ca^{2+} 특이적 염색약인 fluo-4 AM(3 μM , Invitrogen, 미국)으로 30분 동안 실온에서 염색시켰다. Fluo-4 AM은 488 nm 파장의 레이저(Melles Griot Laser, 미국)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. Ca^{2+} 스파크를 기록하기 직전에 1 Hz로 일련의 전기 자극을 가하였다(Stimulator I, Hugo Sachs Elektronik, 독일). 이차원 영상을 30 Hz로 NIS Elements AR(version 3.2, Nikon) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 기록하였다. 모든 실험은 실온(22~25°C)에서 시행하였다.

영상 분석

국부 Ca^{2+} 유리는 C++로 자체제작한¹⁴⁾ "RealTimeMicroscopy" PC 프로그램을 사용하여 컴퓨터화된 알고리즘으로 식별하였다. 먼저, 이 알고리즘은 미가공 영상으로부터 x와 y 방향을 따라 평

균 배경 신호(F_0)를 제거했다. 픽셀 형광 비(F/F_0)가 0.3 이하일 경우 저역필터(low-pass filtering)를 통해 신호를 0으로 맞춘 반면 0.3 보다 밝은 신호는 그대로 유지시켰다. 그리고 "서로 연결된 0이 아닌 시그널들"로 정의된 "그룹들"("국부 최댓값")이 Ca^{2+} 스파크의 후보들로 식별되었다. 시그널과 그룹 사이의 거리가 특정 거리($\leq 1.2 \mu\text{m}$) 이하일 경우 그 시그널을 그룹에 포함시켰다. 만약 한 그룹에 이러한 시그널들의 개수가 4개 이상일 경우, 그 그룹을 실제 스파크로 지정하였다. 그 그룹 중 가장 강한 세기를 갖는 자리인 실제 스파크의 가운데 위치가 세포영상위에 도시되었고 좌표로 수치화되었다(참고문헌 15)의 Fig. 4 참조). 스파크의 빈도를 계산하기 위하여 전체 세포의 넓이를 NIS Elements AR software로 측정하였다.

본 실험에서 사용된 murrayafoline-A은 베트남 식물 *Glycosmis stenocarpa*로부터 분리된 것이다(순도: 97.9±0.998%, three batches).²⁾ 이 물질을 먼저 DMSO에 250 mM로 제조한 후, Tyrode 용액(위 참조)에 희석하여 실험에 사용하였다.

통계 분석

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

실험결과 및 고찰

1 Hz의 전기 자극을 세포에 10회 가하고 10초 후에 공초점 현미경으로 세포 내 형광 신호를 초당 30장의 2차원 영상 기록 속도로 2초간 녹화하였다(Fig. 1A, Con). 25 μM murrayafoline-A를 3분간 흘려준 후, 같은 방법으로 Ca^{2+} 스파크를 기록하였다. 이 약물은 약 2~3분 처리 후 최대 양성 변력 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다.⁶⁾ Ca^{2+} 스파크 발생 빈도는 murrayafoline-A에 의해 현저히 증가하였다(Fig. 1A, Mu-A). 이렇게 2초간 기록한 60장의 영상들을 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 각 영상별로 Ca^{2+} 스파크의 발생 위치를 도시한 후, 장별 스파크의 개수를 세어 시간에 대한 그래프로 나타내었다(Fig. 1B). 이 시간별 그래프를 통해서 murrayafoline-A에 의한 Ca^{2+} 스파크 발생빈도 증가를 더 쉽게 관찰할 수 있었다. 13개의 세포에서 반복 실험한 결과의 통계치를 Fig. 1C에 나타내었다. Ca^{2+} 스파크 발생 빈도는 25 μM murrayafoline-A에 의해 약 1.58배 증가하였다(단위 : events/(10³ $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}$), control, 2.60±0.40; murrayafoline-A, 4.12±0.56, P<0.01).

관찰된 murrayafoline-A에 의한 Ca^{2+} 스파크 빈도 증가 효과를 다양한 농도(1, 10, 100, 200 μM)의 murrayafoline-A 처리 시 측정하였다. Fig. 2에 murrayafoline-A의 농도별 Ca^{2+} 스파크 빈

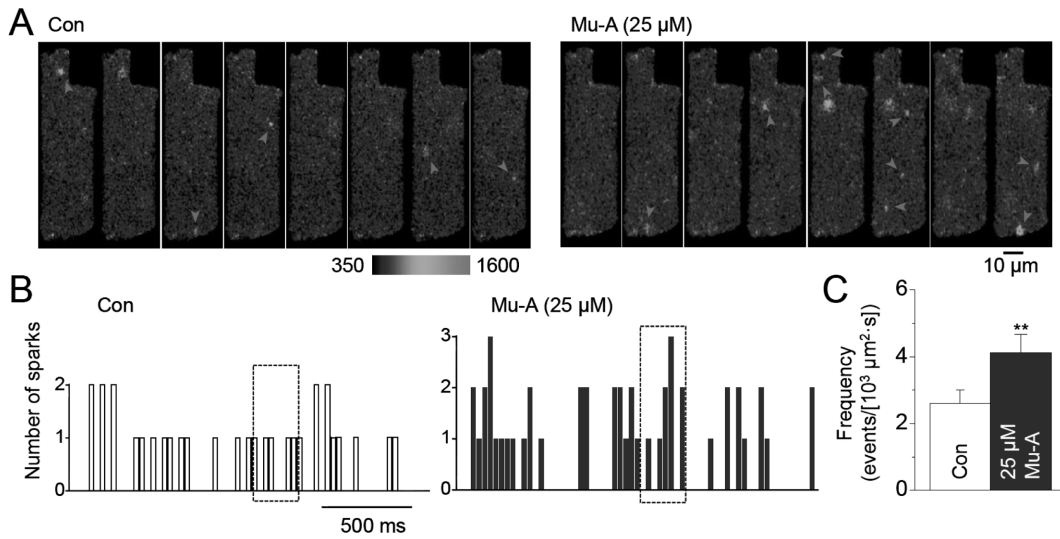


Fig. 1 – Increase in Ca²⁺ spark frequency by murrayafoline-A. (A) Series of sequential two-dimensional confocal Ca²⁺ images measured from a representative myocyte before and after 3-min application of 25 μM murrayafoline-A, showing higher propensity for Ca²⁺ sparks (arrowheads) in the presence of murrayafoline-A. The images were recorded during the period marked by the boxes in panel B. (B) Plots of total number of sparks, detected at each image frame, versus recording time before and after exposure to murrayafoline-A. (C) Mean Ca²⁺ spark frequency measured in the absence (Con) and presence of 25 μM murrayafoline-A (n=13, P<0.01). **P<0.01.

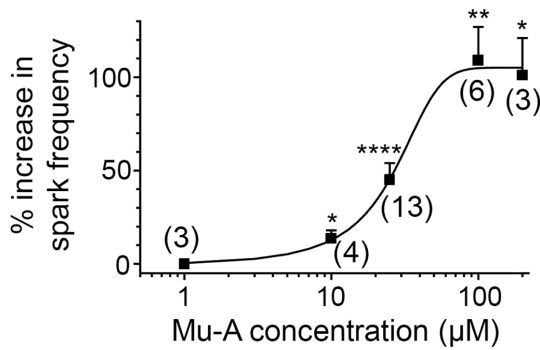


Fig. 2 – Concentration-dependence of % increase in spark frequency by murrayafoline-A. Numbers in the parenthesis indicate number of cells. *P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001.

도 증가 효과를 %로 나타내어 도시하였다. Murrayafoline-A의 농도가 높을수록 Ca²⁺ 스파크 빈도 증가는 더 크게 관찰되었다. 농도-효과 관계를 Hill 식으로 fitting하여, EC₅₀ 값이 28±6.4 μM, 최대 효과가 약 2배임을 알 수 있었다. 이 때 얻어진 Hill 상수는 2.3이었고, 이 값으로 물질 작용이 협력적(cooperative)으로 나타남을 알 수 있었다. 이 결과들은 murrayafoline-A가 심실 근육세포 라이아노딘 수용체 활성을 *in situ* 수준에서 항진시킴을 나타낸다.

Ca²⁺ 스파크의 활성화 과정은 근소포체 내부 Ca²⁺ 양이 증가할수록 그 역치가 낮아진다고 알려져 있다.¹¹⁾ 다음 실험에서는 murrayafoline-A에 의해 스파크 빈도가 증가한 것이 이러한 근소포체 내부 Ca²⁺ 양의 증가에 의하는 지를 알아보려고 하였다. 근소포체 내의 Ca²⁺ 저장량은 고농도의 카페인(cafeine, 10 mM)

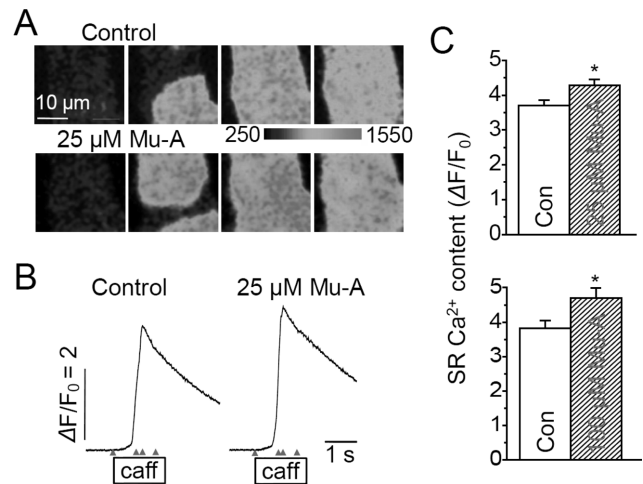


Fig. 3 – Increases of SR Ca²⁺ content and fractional release by murrayafoline-A. (A) Series of two-dimensional confocal Ca²⁺ images recorded (120 Hz) in a representative cell during caffeine (10 mM) application before and after 3-min application of 25 μM murrayafoline-A. The images were selected at the time points marked by the arrowheads under the traces in panel B. (B) Caffeine-induced Ca²⁺ transients in the absence and presence of murrayafoline-A, measured from the confocal Ca²⁺ images shown in panel A. (C) Comparison of mean magnitude of caffeine-induced Ca²⁺ transients (ΔF/F₀) between control and 25 (n=10, P<0.05) and 100 μM (n=5, P<0.05) murrayafoline-A. *P<0.05 vs. control (Con).

을 처리하여 발생하는 세포질 Ca²⁺ transient의 크기로 측정되었다(Fig. 3A, 3B). 고농도의 카페인(10 mM)은 근소포체 라이아노딘 수용체를 모두 활성화 시켜 대부분의 Ca²⁺을 세포질로 유리시킨

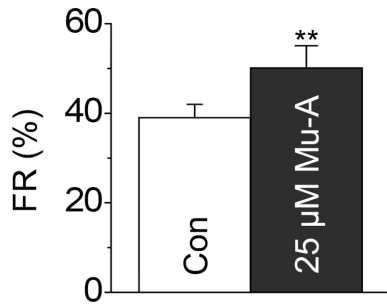


Fig. 4 – Comparison of average fractional release (FR) between control and 25 μM murrayafoline-A (n=10). ** $P < 0.01$ vs. control (Con).

다고 알려져 있어서, 근소포체 Ca^{2+} 저장량의 측정에 사용되어 왔다.¹⁶⁾ 카페인을 처리하기 전, 세포에 1 Hz로 활동전위를 10회 이상 일으켜 일정한 Ca^{2+} transient가 나타남을 확인하였다. 카페인으로 유도된 Ca^{2+} transient의 크기는 약물이 없을 때 보다 약물을 처리한 후에 농도 의존적으로 증가하였다(25 μM murrayafoline-A에서 control의 약 116%; 100 μM murrayafoline-A에서 control의 약 123%; $P < 0.05$; Fig. 3B, 3C). 이 결과는 murrayafoline-A가 SR Ca^{2+} 저장량의 증가를 일으킴을 보여준다. 이에 대한 기전은 아직 뚜렷하지 않으나, 한 가지 가능한 기전으로, 이 물질에 의한 L-type Ca^{2+} 전류의 증가를 들 수 있다.⁶⁾

근소포체 총 Ca^{2+} 저장량 대비 탈분극시의 Ca^{2+} 유리량을 나타내는 fractional release¹⁷⁾에 대한 murrayafoline-A의 효과를 고찰하였다. Fractional release는 카페인으로 유도된 Ca^{2+} transient의 크기에 대한 전기 자극 시 Ca^{2+} transient 크기의 백분율로 계산되었다. Fractional release는 25 μM murrayafoline-A 처리 전 평균 $39.0 \pm 3.0\%$ 이었으며, 약물 처리 후 $50.1 \pm 5.1\%$ 로 현저히 증가하였다(n=10; 약 20% 증가; $P < 0.01$; Fig. 4). 이 실험 결과는 murrayafoline-A가 근소포체 Ca^{2+} 저장량뿐만 아니라 단위 저장량에 대한 라이아노딘 수용체 자체의 Ca^{2+} 유리 효율도 증가시킴을 보여준다.

Murrayafoline-A는 양성 변력 효과를 나타내는 물질로 심부전 치료 효용이 있을 것으로 간주 될 수 있다. 그러나 본 연구 결과로 미루어, 심부전 심실근세포에서 나타나는 자발성 Ca^{2+} 유리를 이 약물이 더 증가 시킬 수 있을 것으로 생각되고, 이에 의한 부정맥 유발 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 앞으로 이 약물의 정확한 작용 기전의 규명 및 질환 군에서의 실험이 그 치료 효용 판단을 위해 요구된다.

결 론

본 연구에서는 분리한 백서 심실 근세포에서 자발적 Ca^{2+} 스파크의 발생 빈도 및 근소포체 Ca^{2+} 저장량이 murrayafoline-A에 의하여 현저히 증가됨을 보여주었다. 이 결과들은 murrayafoline-

A에 의한 심실세포 양성 변력 반응이 라이아노딘 수용체들의 활성 증가로 인한 근소포체 Ca^{2+} 유리의 증가에 일부 기인할 수 있음을 보여준다. 또한 SR Ca^{2+} 양에 대한 Ca^{2+} 유리 효율의 증가는 이 약물이 SR Ca^{2+} 양과 별개로 라이아노딘 수용체에 작용함을 보여준다.

감사의 말씀

본 연구는 2014년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 1) Furukawa, H., Wu, T. S., Ohta, T. and Kuoh, C. S. : Chemical constituents of *Murraya euchrestifolia* HAYATA. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4132 (1985).
- 2) Cuong, N. M., Hung, T. Q., Sung, T. V. and Taylor, W. C. : A new dimeric carbazole alkaloid from *Glycosmis stenocarpha* roots. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 1175 (2004).
- 3) Cui, C. B., Yan, S. Y., Cai, B. and Yao, X. S. : Carbazole alkaloids as new cell cycle inhibitor and apoptosis inducers from *Clausena dunniana* Levl. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **4**, 233 (2002).
- 4) Choi, H., Gwak, J., Cho, M., Ryu, M. J., Lee, J. H., Kim, S. K., Kim, Y. H., Lee, G. W., Yun, M. Y., Cuong, N. M., Shin, J. G., Song, G. Y. and Oh, S. : Murrayafoline A attenuates the Wnt/beta-catenin pathway by promoting the degradation of intracellular beta-catenin proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 915 (2010).
- 5) Itoigawa, M., Kashiwada, Y., Ito, C., Furukawa, H., Tachibana, Y., Bastow, K. F. and Lee, K. H. : Antitumor agents, 203, carbazole alkaloid murrayaquinone A and related synthetic carbazole quinones as cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* **63**, 893 (2000).
- 6) Son, M. J., Chidipi, B., Kim, J. C., Huong, T. T., Tai, B. H., Kim, Y. H., Ahn, J. R., Cuong, N. M. and Woo, S. H. : Alterations of contractions and L-type Ca^{2+} currents by murrayafoline-A in rat ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 81 (2014).
- 7) Beuckelmann, D. J. and Wier, W. G. : Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J. Physiol.* **405**, 233 (1988).
- 8) Cleemann, L. and Morad, M. : Role of Ca^{2+} channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from Ca^{2+} transients and contraction. *J. Physiol.* **432**, 283 (1991).
- 9) 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).
- 10) Cheng, H., Lederer, W. J. and Cannell, M. B. : Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling

- in heart muscle. *Science* **262**, 740 (1993).
- 11) Satoh, H., Blatter, L. A. and Bers, D. M. : Effects of $[Ca^{2+}]_i$, SR Ca^{2+} load, and rest on Ca^{2+} spark frequency in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **272**, H657 (1997).
 - 12) Kettlun, C., Gonzalez, A., Rios, E. and Fill, M. : Unitary Ca^{2+} current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor channels under near-physiological ionic conditions. *J. Gen. Physiol.* **122**, 407 (2003).
 - 13) Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Ca^{2+} current-gated focal and local Ca^{2+} release in rat atrial myocytes: evidence from rapid 2-D confocal imaging. *J. Physiol.* **543**, 439 (2002).
 - 14) Subedi, K. P., Kim, J. C., Kang, M., Son, M. J., Kim, Y. S. and Woo, S. H. : Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca^{2+} sparks, but not action potential-induced Ca^{2+} signaling in cardiac myocytes. *Cell Calcium* **49**, 136 (2011).
 - 15) Kim, J. C., Son, M. J., Subedi, K. P., Li, Y., Ahn, J. R. and Woo, S. H. : Atrial local Ca^{2+} signaling and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **103**, 59 (2010).
 - 16) Woo, S. H., Cleemann, L. and Morad, M. : Diversity of atrial local Ca^{2+} signalling : evidence from 2-D confocal imaging in Ca^{2+} buffered rat atrial myocytes. *J. Physiol.* **567**, 905 (2005).
 - 17) Bassani, J. W. M., Yuan, W. and Bers, D. M. : Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **268**, C1313 (1995).