大韓獸醫學會誌(1987) 第27卷 第1號
Korean J. Vet. Res. (1987) Vol. 27, No. 1, pp. 27~34

토끼 심장세포의 전기적 활동에 대한 갑상선 호르몬의 효과

홍 성 근·윤 효 인
경상대학교 의과대학
(1987. 3. 13 接受)

Effects of Thyroid Hormone *in vitro* on the Electrical Activity of the Rabbit Heart Cell

Seong-geun Hong and Hyo-in Yun
College of Medicine, Gyeongsang National University
(Received March 13th, 1987)

Abstract : To verify the direct effects of the thyroid hormone (T_3) on the rabbit heart, T_3-Tyrode solution *in vitro* was perfused on the normal atrial muscles and enzymatically isolated ventricular myocytes of the rabbit. All the experimental procedures were conducted at 35°C and the same procedures were repeated after Ca. 120 minutes from the beginning of T_3-Tyrode perfusion. Compared to the state between the normal Tyrode solution and T_3-Tyrode solution, results were observed on the same cells by electrophysiological methods (conventional intracellular recording and whole cell patch clamping) as soon as possible.

The results obtained were as follows :

1. Action potential duration (APD) on the left atrial muscle was reduced under the perfusion of T_3-Tyrode.
2. Absolute refractory period was shortened by T_3-Tyrode perfusion. (117 msec./114 msec., 90 msec./78 msec.)
3. Maximal Ca currents (i_{Ca}) were decreased in single ventricular myocytes under the T_3-Tyrode (2.98 nA) than under the normal Tyrode (6.65 nA).
4. On I-V relation, reversal potential was shifted to lower membrane potential and membrane potential showing maximal i_{Ca} was lowered from +10 mV to −20 mV by T_3 effect.
5. Above results were likely to explain that tachycardia in the hyperthyroid state was caused in part by the reduced repolarization phase and the reduced refractory period due to the decrease of the Ca current.

서 론

갑상선 호르몬 작용이 항진된 상태(hyperthyroid state)하에서 심방세동(atrial fibrillation), 심실 수축력의 증가, 심박동수의 증가 현상들은 그 기전이 밝혀지지 않은채 공통적으로 보고되고 있으며 임상적으로도 관심의 대상이 되고 있다(Klein과 Levey, 1984). 특히 심박동의 증가는 심장 향도잡이 조직의 흥분성 증가, 심장세포의 활동 전압기간(action potential duration, APD)의 감소, 흥분전파속도(conduction velocity)의 증가 등으로 설명될 수 있다. 심방세포수준에서 활동전압상의 parameter들의 변화에 관하여 동방결절(sino-atrial, SA node), 심방근(atrial muscle)세포, Purkinje 섬유 등에서 관찰하였으나 활동전압을 구성하고

있는 세포막을 통한 이온전류(ionic currents)에 대한 triiodothyronine(T_3) 효과에 관한 실험이 제대로 이루어지지 않았다(Jaeger, 1981: Johnson 등, 1973; Arnsdorf과 Childers, 1970; Freedberg 등, 1970) 한편 hyperthyroid 상태하에서의 APD 감소는 재분극(repolarization)시기의 감소에 따르는 potassium current의 변화가 시사되었고, 홍성근 등(1986)은 SA node에서 calcium blocker인 $MnCl_2$를 이용한 실험결과 정상(euthyroid state) 상태의 조직보다 낮은 농도의 $MnCl_2$에서 흥분성의 소실을 관찰, 보고하였다. 따라서 본 실험은 정상적인 토끼의 심장 절편과 심근단일세포에 갑상선 호르몬이 담긴 실험용액을 직접 관류시켜 세포막 전압 및 whole cell patch clamp 방법을 이용하여 calcium current의 변화를 관찰하고자 하였다(Marty와 Neher, 1983; Hamill등, 1981).

재료 및 방법

실험 조직 준비 : 갑상선 호르몬의 직접적인 작용을 관찰하기 위하여 암수구별없이 건강하다고 인정되는 토끼에서 심장을 적출하여 향도잡이 조직이 없는 좌측 심방근 절편을 3×4mm 크기로 분리한 다음 실험용기(experimental chamber) 내로 옮겨 유리미세 전극을 삽입하고 100% 산소로 포화된 실험 용액을 관류시키면서 활동전압 및 실험적 절대 불응기를 측정하였다.

심장단일세포는 토끼를 Nembutal (30mg/kg)을 정맥내로 주입하여 마취시킨 상태에서 흉곽을 열고 심장을 적출한 다음 Langendorff 실험장치를 통하여 collagenase (type I, Sigma Chemical Co.) 0.3mg/ml가 담긴 Ca-free Tyrode에서 40분간 incubation시킨 후 단일세포로 분리하였다. 심근단일 세포는 whole cell patch clamp 방법을 이용하여 Ca 전류를 측정하는데 사용하였다. 모든 실험은 순환수조를 통하여 35°C로 유지시키면서 진행하였다.

기록장치 : 재래식 세포내 막전압 기록(conventional intracellular recording)은 Fig. 1과 같이 3M KCl로 채운 유리미세전극(glass microelectrode)을 세포내에 삽입한 후 자극기를 통하여 조직내에 자극을 주어 나타난 활동전압을 10배 증폭기를 통하여 증폭된 파형을 PCM (pulse code modulator, SONY 501ES) 을 통하여 digital 신호로 바꾼다음 VCR(video casette recorder)의 Tape의 영상 track상에 활동전압 파형과 trigger 신호를 입력시키고 음성 track 상에 실험진행 과정을 녹음시키면서 동시에 oscilloscope(Tektronix, 5113), physiograph (Narco Bioscience Co., MK-IV-P, 4 channel), digital volt meter, speaker를 통하여 실험결과를 관찰하였다.

Whole cell patch clmap 방법을 이용한 기록은 Fig. 2와 같이 이온전류 측정을 위한 internal pipette 용액을 채운 내반경 3~4μm 크기의 작은 관을 통하여 자극시에 흐르는 이온전류를 whole cell 전류기록용 증폭기(amplifier)를 거쳐 나온 신호를 PCM을 통하여 digital 신호로 바꾼다음 VCR tape 상에 이온전류, 자극전압 및 trigger 신호를 입력시키고 동시에 oscilloscope, digital volt meter (DVM)를 관찰하면서 실험을 진행하였다.

실험결과는 VCR tape에 입력된 자료를 storage oscilloscope 스크린상에 재생하여 분석하였다.

진행방법 : 세포내 기록(conventional intracellular recording)은 정상 Tyrode용액 하에서 좌측 심방근 절편의 세포내에 유리미세 전극을 삽입하고 30분이상 안정 시킨 후 실험을 시작하였다.

갑상선 호르몬의 효과는 정상 Tyrode용액 하에서 실험이 끝난다음 T_3-Tyrode를 120분간 관류시킨 후 2시간 이후에 나타나는 결과를 관찰하기 위하여 정상 Tyrode 용액 관류시와 동일한 요령으로 진행하면서 관찰 기록하였다.

전류자극(current pulse, 4 msec. duration, 600 msec. interval, i.e. 1.67Hz)를 이용하여 좌측 심방근 절편에 대한 역치자극(threshold stimulus)을 결정하여 역치자극강도(current intensity of threshold stimulus)의 2배인 기준자극(standard stimulus)을 주면서 활동전압을 기록하였다. 부정맥 (arrythmia) 발생여부는 기준 자극빈도를 점점 높이면서(1,000 msec., 1Hz에서 100 msec., 10Hz까지) 200번의 연속자극시에 나타나는 매자극에 대한 활동 전압 발생유무로 판정하였다. 절대불응기는 시간간격(time interval)을 두고 2번의 기준자극(S1, S2)을 가하여 2번째 자극(S2)에 대한 반응이 나타나기 직전까지의 시간으로 결정하였다.

Whole cell clamp 기록은 internal pippette용액(Table 2)을 채운 patch관을 심근단일세포(single ventricular myocyte)에 접촉시킨 후 관내를 통하여 음압(negative pressure)을 주어 giga-ohm seal을 형성한 다음, 추가로 음압을 가하여 관내에 수용된 세포막을 파괴하여 whole cell patch를 형성하였다(Fig. 3, B). 세포막을 통하여 Na current가 흐르지 않도록 세포막 전압(holding potential)을 -40 mV로 유지시키고 자극(200 msec. duration, depolarization pulse)을 주어 자극기간 동안 나타나는 Ca current를 기록하였다.

실험용액 : 사용된 Tyrode 용액의 조성은 Table 1과 같다.

T_3-Tyrode용액은 정상 Tyrode용액에 3,3',5-sodium-1-triiodothyronine(Sigma Chemical Co.)를 5μg/ml 농도로 첨가한 것을 사용하였고, 심근단일세포에 대한 Ca current 측정시 Tyrode 용액의 Ca 농도를 5mM로 높여 사용하였다. Internal pipette 용액의 조성은 Table 2와 같다.

결 과

기준자극에 대한 심방근 절편에서의 T_3 효과 : 심방근의 동일세포상에서 170 msec. (Ca. 5.9Hz) 간격을 주어 관찰한 결과 Fig. 4와 같이 T_3-Tyrode 용액하에

Table 1. Composition of Experimental Solution (mM/liter)

	Normal Tyrode	T_3-Tyrode
NaCl	140	140
KCl	5.4	5.4
*$CaCl_2$	1.8	1.8
$MgCl_2$	1.0	1.0
Na-1-triiodothyronine	—	5mg
HEPES	5.0	5.0
Glucose	10.0	10.0
pH(at 37°C)	7.4	7.4

* Concentration of $CaCl_2$ was elevated from 1.8mM to 5.0mM on measuring the Ca Current.

Table 2. Composition of Pipette Solution (mM/liter)

K-aspartate	80
KCl	50
KH_2PO_4	10
$MgSO_4$	1
Na_2ATP	3
HEPES	5
EGTA	1
pH(at 37°C)	7.2

* Normal and T_3-Tyrode solution were perfused into the experimental chamber.

* Above solution was applied to cell interior for seperation of calcium current (i_{Ca}).

Table 3. Comparison of Parameters on Atrial Action Potentials between Perfusion of Normal Tyrode and of T_3-Tyrode (unit;msec.)

	Normal Tyrode (1)	T_3-Tyrode (2)	(1)-(2)
75% APD	101.8 (n=20)	73.2 (n=20)	
Absolute Refractory period	117 90	114 78	3 12

Overlapping of 20 action potentials was measured as one unit on the storage oscilloscope.

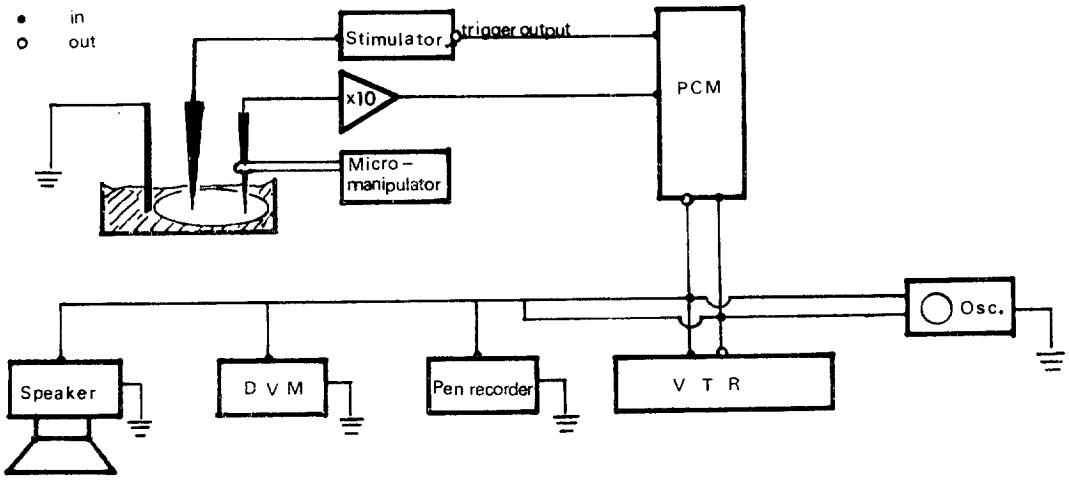

Fig. 1. Circuit diagram for the conventional intracellular recordings.
PCM : pulse code modulator
DVM : digital volt meter
VTR : video tape recorder
Osc. : oscilloscope

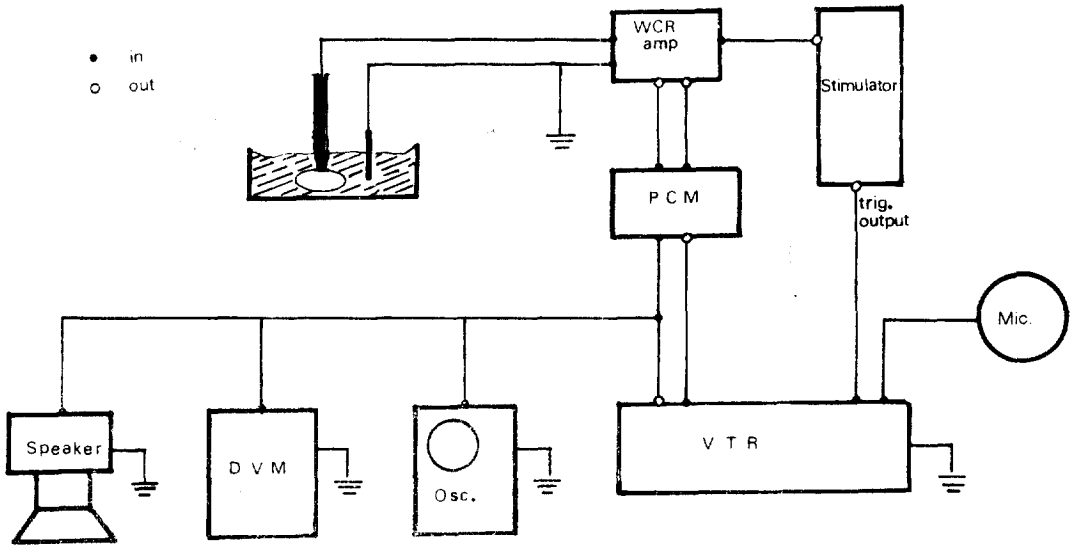

Fig. 2. Circuit diagram for the whole-cell patch recordings.
WCR : whole-cell patch recordings
DVM : digital volt meter
Osc. : oscilloscope
PCM : pulse code modulator
VTR : video tape recorder
Mic. : microphone

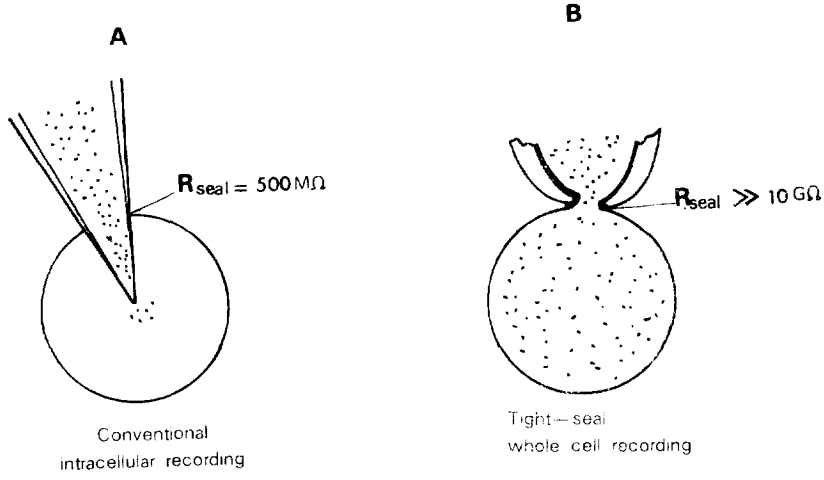

Fig. 3. Modified diagrams of cell-electrode units. The giga-ohm seal forms between the polishing-tipped pipette and the single cell. After membrane was ruptured, internal pipette solution was equilibrated with the cell interior.

서 정상 실험용액 관류시에 비해 쉽게 부정맥(arrhythmia)이 나타남을 볼 수 있었다. 심박동이 빨라지는 현상이 활동전압상에서 반영되고 있는지 알아보기 위하여 기준자극에 의하여 나타나는 활동전압 20개를 storage oscilloscope screen 상에 중첩시켜 75% APD와 불응기를 측정하였다. Fig. 5와 6에서와 같이 정상 Tyrode 용액 관류시보다 T_3-Tyrode 관류시에 75% APD 및 불응기가 감소하였다(Table. 3).

단일심근세포상에서의 T_3에 의한 calcium currents 변화 : T_3-Tyrode 용액관류 개시후 80분 후에 whole cell patch를 형성하여 Ca currents를 측정(Fig. 7)한 다음, 50분 경과 후(관류 개시후 130분 경과) 동일세포에서 같은 요령으로 측정하였다(Fig. 8). 80분 후에 기록한 Ca currents는 정상 Tyrode 용액에 다른 세포

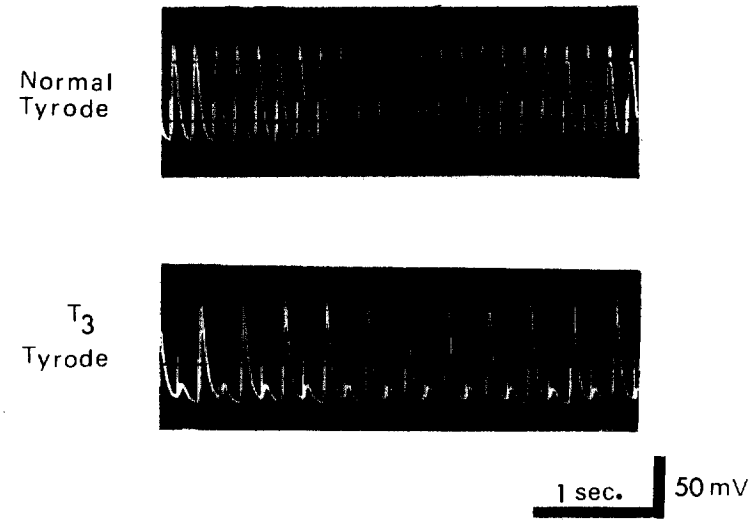

Fig. 4. Onset of arrythmia at the same condition of stimulus by T_3-Tyrode on the same cell.

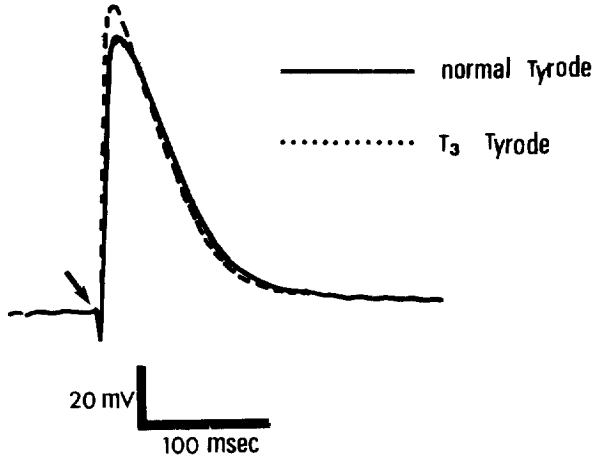

Fig. 5. Decreased action potential duration by T_3-Tyrode.

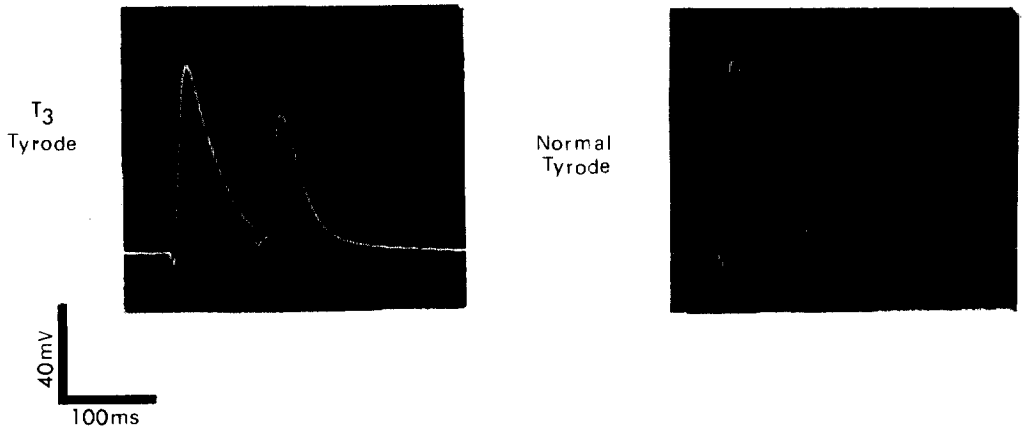

Fig. 6. Effect of T_3 on the refractory period. When second stimulus (80 msec. later after lst stimulus) was applicated, small action potential was occurred under T_3-Tyrode.

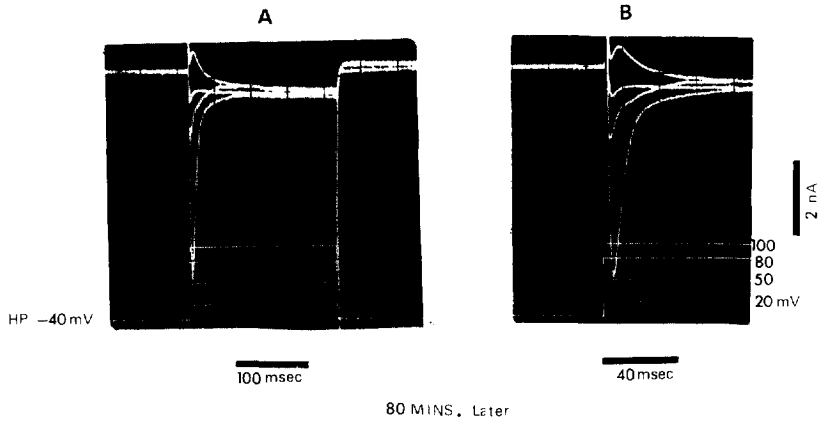

Fig. 7. Calcium currents of the single ventricular myocyte. 80 minutes after the perfusion of T_3-Tyrode.

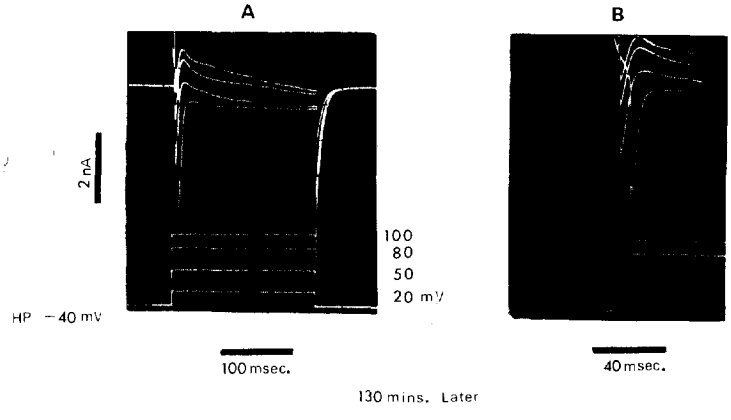

Fig. 8. Calcium currents of the same cell (with that of Fig. 7). 130 minutes later after the perfusion of T_3-Tyrode.

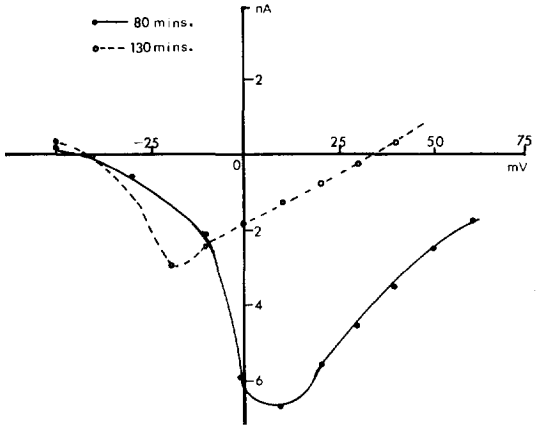

Fig. 9. Current-voltage (I-V) relation curve of Ca currents.

의 Ca currents와 유사한 양상을 보였다. 80분 경과시와 130분 경과후에 기록한 maximal inward Ca currents를 막전압(membrane potential)에 대하여 도식한 결과 Fig. 9와 같이 T_3에 의하여 currents는 그 크기의 감소와 더불어 +10mV에서 −20mV로 shift 되었으며 역전전압 (reversal potential, Erev.)도 +95mV에서 +35mV로 이동하였다.

고 찰

대부분 실험적으로 hyperthyroid상태를 유도하기 위하여 일정기간 전부터 갑상선 호르몬을 투여(Klein과, Levey, 1984; Jaeger 등, 1981; Katagiri 등, 1975; Johnson 등, 1973; Arnsdorf와, Childers, 1970; Freedberg 등, 1970; 홍성근 등, 1986)하여 유도하였으나 호르몬의 특성상 다른 표적기관이나 장기의 상호 협동

에 의한 작용의 결과가 영향을 미칠 수 있으므로(Williams, 1981), 직접적인 효과로 단정하기 어려운 단점이 있기때문에 본 실험에서는 정상적인 조직에 T_3-Tyrode를 *in vitro* 상태에서 직접적인 T_3 효과를 보고자하였다. Hyperthyroid 상태에서 나타나는 공통적인 현상중의 하나인 tachycardia는 sinoatrial(SA) node, atrial muscle, Purkinje fiber에서 관찰되었다(Jaeger, 1981). SA node 활동전압의 이완기 탈분극(diastolic depolarization)시의 dV/dt 값의 증가와 재분극시기가 감소하였고(Johnson, 1973), 심방근에서도 APD감소, dV/dt의 증가를 보였으며 (Arnsdorf와 Childers, 1973), atrial muscle cell의 활동전압에서 나타나는 재분극의 가속화는 외향성 전류의 증가와 두드러진 inward Na current의 보다 빠른 inactivation을 시사하였다(Arnsdorf와 Childers, 1970). 본 실험에서도 APD 감소 및 불응기의 감소를 관찰하였다. 그러나 심장세포의 APD는 일반 근육 세포에 비해 상당히 오랫동안 유지되는 것은 Ca에 의해 반영되는 완만 내향전류(slow inward current, i_{Si})와 potassium outward current($i_{X,1}$)에 의하여 지속되기 때문에 Ca ion의 활동을 고려해야 한다(Noble, 1979; Goldman과 Morad, 1977). 특히 hyperthyroid 상태에서 sarcoplasmic reticulum(SR)에 존재하는 Ca-stimulated ATPase의 활동도가 증가하며 증가된 calcium flux의 조건 하에서 근육의 산소소모율이 SR상의 Ca-stimulated AT Pase에 의해 조절되고 있다는 견해도 있다(Kim과 Smith, 1985; Oppenheimer, 1979; Carmeliet, 1977; Suko, 1973). 한편, APD감소요인으로서 세포밖의 K^+농도 증가는 background potassium conductance의 증가로 설명되었으나, 포유동물의 심장에서는 큰 영향을 주지 못하므로 상대적인 Ca current (i_{Si})의 감소가 큰 비중을 차지하고 있다(Carmeliet, 1977). Hyperthyroid 상태의 rabbit SA node 흥분성은 정상에 비하여 Ca-blocker인 $MnCl_2$에 대하여 민감하게 반응하는 것을 관찰하여 thyroid hormone이 간접적으로 Ca ion의 이동에 관계하고 있음을 시사하였다(홍성근 등, 1986). 본실험에서 maximal inward Ca Current를 도식화 한바 I-V relation curve와 같이 i) i_{Ca}의 현저한 감소, 80분 후의 I-V curve에서 정상적인 세포의 경과와 비슷하게 0 mV를 전후하여 나타난 반면, 130분 후에는 −20 mV에서 최대값을 보여 ii) maximal Ca current threshold의 저하, iii) Ca current의 reversal potential($E_{rev.}$)이 낮은 막전압으로 이동하였음을 보여 타연구자들(Lee등, 1985; Matsuda와 Noma, 1984; Lee와 Tsien, 1982; Hagiwara와 Ohmori, 1982)의 결과와 유사하였다. 이상의 여러 사실로 미루어 calcium ion에 의하여 나타나는 감소가 i) Ca 전류의 inactivation 상태에서의 불완전한 회복 또는 ii) 세포내 Ca 농도증가에 기인하며 또 심장세포의 APD가 i_{Si} 감소에 의한 것이라면 thyroid hormone의 효과에 의한 i_{Ca}의 감소가 부분적으로나마 APD를 감소시키고 이로 인하여 tachycardia 현상의 발생을 일부 설명할 수 있을 것이다.

결 론

갑상선 호르몬이 심장세포에 직접적으로 작용하여 심박동의 증가현상(tachycardia)을 유발하는 기전을 관찰하기 위하여 정상적인 토끼 심장을 적출하여 조직절편과 단일세포로 분리한 다음 전기생리학적인 방법을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 심방근 세포의 활동전압기간(action potential duration, APD)은 정상 Tyrode 용액 관류시보다 T_3-Tyrode용액 관류시에 감소하였다.

2. 심방근 세포의 활동전압 기간중에 나타나는 절대불응기는 T_3-Tyrode 용액 관류시 정상상태보다 줄어들었음을 관찰하였다. (116 msec./114 msec., 90 msec./78 msec.)

3. 심근 단일 세포에서 측정한 Ca current는 T_3-Tyrode 용액에 의하여 6.65 nA에서 2.98 nA로 감소하였다.

4. 심근 단일세포에서 측정한 Ca currents를 막전압에 대하여 plotting한 결과, maximal Ca current 값을 보이는 막전압과 reversal potential ($E_{rev.}$)이 낮은 막전압으로 이동하였다(shift to lower membrane potential).

5. 이상의 결과로 보아 갑상선 호르몬은 심장세포 수준에서 직접적으로 영향을 미치며, 특히 Ca current의 감소를 초래하여 활동전압기간을 줄임으로해서 심박동의 증가에 기여하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Arnsdorf, M. F. and Childers, R. W. (1970) Atrial electrophysiology in experimental hyperthyroidism in rabbits. Circ. Res. XXIV:575~581.

Carmeliet, E. (1977) Description of the effects of frequency on the shape and duration of the cardiac action potential. J. de Phyologie. 73: 903~923.

Freedberg, A. S., Papp, J. Gy. and Vaughan Williams, E. M. (1970) The effects of altered thyroid state on atrial intracellular potentials. J.

Physiol. 207:357~369.

Goldman, Y. and Morad, M. (1977) Ionic membrane conductance during the time course of the cardiac action potential. J. Physiol. 268:655~695.

Hagiwara, S. and Ohmori, H. (1982) Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp. J. Physiol. 331:231~251.

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

Jaeger, J. M., Houser, S. R. and Spann, J. F., Jr. (1981) Effects of thyroid hormone on the canine Purkinje fiber transmembrane potential. Am. J. Physiol. 240:H934~H940.

Johnson, P. N., Freedberg, A. S., and Marshall, J. M. (1973) Action of thyroid hormone on the transmembrane potentials from sinoatrial node cells and atrial muscle in isolated atria of rabbits. Cardiol. 58:273~289.

Katagiri, T., Freedberg, A. S. and Morkin, E. (1975) Effects of N-ethylmaleimide on the ATPase activities of cardiac myosin from thyrotoxic rabbits. Life Sci. 16:1079~1087.

Kim, D. H. and Smith, T. W. (1985) Effects of thyroid hormone on calcium handling in cultured chick ventricular cells. J. Physiol., 364: 131~149.

Klein, I. and Levey, G. S. (1984) New perspectives on thyroid hormone, catecholamines and the heart. Am. J. Med., 76:2.

Lee, K. S. and Tsien, R. W. (1982) Reversal current through calcium channels in dialysed single heart cells. Nature, 297:498~501.

Lee, K. S., Marvan, E. and Tsien, R. W. (1985) Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on the membrane potential and intracellular calcium. J. Physiol., 331:231~252.

Marty, A. and Neher, E. (1983) Tight-seal whole-cell recording in Single Channel Recording ed. by Sakman, B. and Neher, E. Plenun Press, New York.

Matsuda, H. and Noma, A. (1984) Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea pig. J. Physiol., 357:553~573.

Noble, D. (1979) The initiation of heartbeat. 2nd ed., Clarendon, Oxford.

Oppenheimer, J. H. (1979) Thyroid hormone action at the cellular level. Science, 203:971~979.

Suko, J. (1973) The calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum: functional alteration at the different levels of thyroid state in rabbits. J. Physiol., 228:563~582.

Suko, J. (1973) The calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum: functional alteration at the different levels of thyroid state in rabbits. J. Physiol., 228:563~582.

William, R. H. (1981) Textbook of endocrinology. 6th ed., W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 1~14.

홍성근, 권종국, 정순일 (1986) Effect of thyroid hormone on the electrical activity of rabbit heart. 대한생리학회지, 20:17~29.