

심장세포에서 세포내 Ca^{2+} 증가에 의해 활성화되는 Cl^- 통로의 특성과 역할

박춘옥, 김양미, 한재희, 홍성근
경상대학교 의과대학 생리학교실, 심혈관연구소
(1993년 10월 18일 접수)

The characters of Ca^{2+} activated Cl^- channel and its role in the cardiac myocytes

Choon-ok Park, Yang-mi Kim, Jae-hee Haan, Seong-geun Hong

*Department of Physiology and the Institute of Cardiovascular Research,
College of Medicine, Gyeongsang National University*

(Received Oct 18, 1993)

Abstract: The inward tail current after a short depolarizing pulse has been known as Na-Ca exchange current activated by intracellular calcium which forms late plateau of the action potential in rabbit atrial myocytes. Chloride conductance which is also dependent upon calcium concentration has been reported as a possible tail current in many other excitable tissues. Thus, in order to investigate the existence of the calcium activated chloride current and its contribution to tail current, whole cell voltage clamp measurement has been made in single atrial cells of the rabbit. The current was recorded during repolarization following a brief 2 ms depolarizing pulse to +40 mV from a holding potential of -70 mV.

When voltage-sensitive transient outward current was blocked by 2 mM 4-aminopyridine or replacement potassium with cesium, the tail current were abolished by ryanodine(1 μ M) or diltiazem(10 μ M) and turned out to be calcium dependent. The magnitudes of the tail currents were increased when intracellular chloride concentration was increased to 131 mM from 21 mM. The current was decreased by extracellular sodium reduction when intracellular chloride concentration was low(21 mM), but it was little affected by extracellular sodium reduction when intracellular chloride concentration was high(131 mM). The current-voltage relationship of the difference current before and after extracellular sodium reduction, shows an exponential voltage dependence with the largest magnitude of the current occurring at negative potentials, which is similar to current-voltage relationship at negative potentials, which is similar to current-voltage relationship of Na-Ca exchange current. The current was also decreased by 10 μ M niflumic acid and 1 mM bumetanide, which is well known anion channel blockers. The reversal potentials shifted according to changes in chloride concentration. The current-voltage relationships of the niflumic acid-sensitive currents in high and low concentration of chloride were well fitted to those predicted as chloride current.

From the above results, it is concluded that calcium activated chloride component exists in the tail current with

*이 논문은 1992년도 재단법인 경상대학교 연구장학재단 학술연구에 의하여 연구되었음.

Na-Ca exchange current and it shows the reversal of tail current. Therefore it is thought that in the physiologic condition it leads to rapid end of action potential which inhibits calcium influx and it contributes to maintain the low intracellular calcium concentration with Na-Ca exchange mechanism.

Key words : Ca^{2+} activated Cl current, Na-Ca exchange current, whole cell voltage clamp, single atrial cell.

서 론

세포내 Ca^{2+} 는 기본적인 세포의 생리적 기능을 조절하는 이차전령으로서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. Ca^{2+} 에 의하여 조절되는 과정으로는 흥분 수축 연결기전, 분비기전, 세포간 연락기전, 세포분열, 감각기전 등이 알려져있다. 세포내 Ca^{2+} 농도는 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입, Na-Ca exchange 및 Ca-pump에 의한 Ca^{2+} 의 유출 및 근장그물에서의 Ca^{2+} 유리와 재흡수 등 여러방향으로 Ca^{2+} 이동이 복합적으로 작용하여 조절된다. Ca^{2+} 이 이차전령의 역할을 수행하기 위해서는 세포내 Ca^{2+} 를 매우 낮게 유지해야 하므로 세포내에서 증가된 Ca^{2+} 를 낮게 유지하는 기능을 대단히 중요하다. 이러한 기전으로 Ca-펌프와 Na-Ca 교환기전이 알려져 있는데 특히 세포막을 통하여 밖으로 Ca^{2+} 를 내보내는 기전으로서 Na-Ca 교환기전이 중요하다.

Na-Ca 교환기전은 심장세포내 Ca^{2+} 농도조절과 함께 심근세포의 수축력에 매우 중요한 기전으로 연구되어 왔는데, Na-Ca 교환기전은 Na^+ 농도경사가 수축력에 영향을 미친다는 사실로부터 그 존재가 추론되어 실제로 동위원소 등의 측정 등에 의하여 그 존재가 증명되었고²⁹, 많은 연구를 통하여 세포내로와 세포외로의 양쪽 방향으로 돌 수 있으며 Na^+ 와 Ca^{2+} 의 교환비율이 3:1로서 전류발생적인 것이 밝혀졌다^{19,24}. 그러므로 심근에서 Na-Ca 교환기전은 활동전압시 유입된 Ca^{2+} 을 세포밖으로 내보냄으로써 세포내 Ca^{2+} 농도를 낮게 유지하는데 중심적인 역할을 할 뿐만 아니라 이때 발생하는 전류는 활동전압의 형성에도 기여하리라 생각되어왔다. 이에 관한 연구는 활동전압에 late plateau 성분을 갖는 쥐의 심실근과 토끼의 심방근을 중심으로 이루어졌는데 mitchell 등²³은 late plateau를 이루는 기전으로서 Ca^{2+} 의존적인 내향전류가 관련됨을 밝혔다. Earm 등³⁰은 이 성분의 전류가 Ca^{2+} 전류를 발생시키는 저분극 pulse 후에 기록되는 느린내향전류(tail inward current)로서 세포내 Ca^{2+} transient에 의해 활성화되고 전압의존성이 지수함수적이며 Na^+ 농도경사에 의존적인 Na-Ca 교환전류와 매우 유사한 성상을 가진 전류임을 밝힌 바 있다. 또한 이 tail 전류는 생리적 상태 Ca^{2+} transient를 가장 신속하게 그리고 정량적으로 제시하는 자료로 인정되고 있다¹⁵.

그러나 tail전류는 저분극 pulse에 의한 세포내 Ca^{2+} 증가에 의해 활성화되는 것으로, 세포내 Ca^{2+} 증가에 의해 활성화되는 다른 전류들에 의해 영향을 받을 수 있다. 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 전류로는 Ca^{2+} 의존성 K^+ 전류, 비선택적 양이온 통로를 통한 전류⁷, Na-Ca 교환전류²², Ca^{2+} 의존성 Cl 전류 등이 보고되어 있다. 신경세포²⁶나 평활근세포²⁷에서 기록된 저분극 자극 후에 나타나는 tail 전류는 그 주성분이 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 Cl 전류로서 알려져 있는데 이는 심근에서 기록되었던 tail 전류와 매우 유사한 형태의 전류로서 나타난다. 그러므로 본 연구에서는 토끼심방근세포에서 세포내, 외 환경을 실험자의 의도대로 변화시킬 수 있는 단일 심근세포에서의 막전압고정법(whole cell patch clamp technique)을 이용하여 저분극자극 후에 활성화되는 tail 전류를 기록하고 이에 미치는 Cl의 영향을 비교분석하여, 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 Cl 전류가 존재하는지를 확인하고, 그 특성 및 역할을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

단일 심방근 세포의 분리 : Kimura 등¹⁹의 방법을 사용하였다. 몸무게 0.8~1kg 정도되는 토끼의 대동맥에 catheter를 넣어 Langendorff 관류장치에 연결시킨 다음 37°C에서 역방향 관류(retrograde perfusion)를 시행하였다. Ca^{2+} free Tyrode 용액으로 5분간 관류시킨 후 collagenase(4 mg/50 ml, Yakult)가 함유된 low Ca^{2+} Tyrode 용액(Ca^{2+} 농도 : 30~50 μ M)으로 10~15분 관류시킨 다음, 심방부분을 떼어내서 잘 흔들어 주고 떨어져나온 세포들을 low Cl, high K^+ 용액에 넣어 4°C에 보관하였다가 사용하였다.

실험용액 : 정상 Tyrode 용액은(mM, 이하 같음); NaCl, 140; KCl, 5.4; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; NaH_2PO_4 , 0.33; glucose, 5; HEPES, 5(pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추는)이고, 전극용액은 K-aspartate, 110; Mg-ATP, 5; di-Tris-creatine phosphate, 5; $MgCl_2$, 1; KCl, 20; HEPES 10; EGTA 0.1(pH는 KOH로 적정하여 pH 7.4로 맞추는)로 하였다. 세포내 Cl 농도를 높이기 위해서는 K-aspartate를 KCl로 대체시켜 주었다. 일과성

외향전류를 억제하기 위해서는 K-aspartate를 Cs-aspartate로, KCl 대신 CsCl로 바꾸어 주고(이때 pH 적정도 CsOH로 함), KCl 20 mM은 TEA-Cl로 대신 하였다. 세포의 용액의 Na⁺ 농도를 감소시키기 위하여는 NaCl을 LiCl나 N-methylglucamine으로 대체하였고, Cl 농도를 감소시키기 위하여는 NaCl을 Na-aspartate 나 Na-isethionate로 대체하였다.

Voltage clamp : 단일 심방근을 inverted microscope 상에 설치한 실험용기에 옮긴 후 patch clamp 증폭기(List, EPC-7)을 써서 Hamill 등¹³의 방법으로 막전압고정을 하였다. 실험용액을 1 ml/min의 속도로 관류시켜 실험용기내 온도를 37°C로 유지하면서, tip 저항이 2~3 MΩ인 유리전극을 전극용액으로 채운 후 세포막에 접근시키고 -10~-20 cm H₂O의 음압을 가하여 giga seal을 만든 후 음압을 높여 세포막을 터뜨린(rupture)상태에서 patch clamp 증폭기를 사용하여 단일세포 막전압 고정법(whole cell voltage clamp)을 하였다¹³. 세포내 Ca²⁺을 활성화하기 위하여는 유지전압 -70 mV에서 +40 mV로 2 ms의 짧은 자극을 주었고, 여러 수준의 전압으로 재분극을 시킬 때 나타나는 전류를 기록하였다. 실험 결과는 digital oscilloscope(Hitachi, 6041)와 펜기록기(Gould, 220)에 기록하며 동시에 PCM data recorder(Medical system)에 저장하였다가 분석하였다.

결 과

느린 내향전류(tail inward current)를 기록하기 위하여 막전압을 -70 mV로 유지시키며 30초 간격으로 2 ms동안 +40 mV까지의 저분극 자극을 주었다(Fig 1A). 저분극 자극을 주는 동안 Ca²⁺ 전류가 활성화되고 세포내 Ca²⁺ 저장고에서 Ca²⁺ 유리가 일어남으로써 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가하는데, 이에 의해 Ca²⁺ 의존적인 전류들이 활성화된다. 짧은 저분극 자극 후 다시 재분극 시킬 때 느린 내향전류로서 나타나는 tail 전류는 세포내 Ca²⁺ 농도 증가에 의해 활성화되는 Na-Ca 교환전류가 주성분인 것으로 보고되어 왔다^{10,12}.

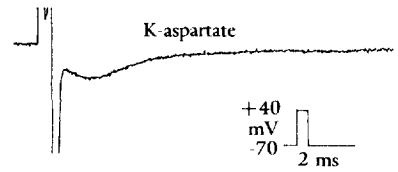
Fig 1에서는 각각 세포내 Cl 농도가 21 mM 함유되어 있는 K-aspartate 전극용액에서와(Fig 1A) 세포내 Cl 농도가 131 mM인 KCl 전극용액을 사용하여(Fig 1B) 기록한 tail 전류의 대표적인 예를 보여 주고 있다. 전극용액의 다른 성분과 조건은 같으며 세포의 Cl 농도도 146 mM로 동일하였다(실험방법 참조). 두 경우 모두 저분극 자극의 기간을 2 ms로 하고 자극크기를 유지전압으로부터 +110 mV로 할 때 tail 전류의 크기

가 가장 크게 기록되었다. 그러므로 본 실험에서의 저분극자극은 -70 mV로부터 +40 mV까지 2 ms 동안 30초 간격으로 주는 것을 항정상태의 기준으로 하였다.

Tail 전류에 대한 세포내 Cl 농도증가의 영향: 저분극 자극 후 재분극시 기록되는 tail 내향전류의 크기는 세포의 크기에 따라 차이가 있었으나, 최고치(peak)의 값은 Cl 농도가 낮은 K-aspartate 전극용액의 경우에는 200~400 pA이었고, Cl 농도가 높은 KCl 전극용액의 경우에는 600~800 pA이었다. 간혹 K-aspartate 전극용액에서 500 pA 이상을 보이는 것과 KCl 전극용액에서 500 pA 미만으로 기록되는 것들도 있었으나, 같은 동물에서 얻어진 비슷한 크기의 세포들에서 기록되는 tail 내향전류의 크기는 전극용액의 종류에 따라 현저한 차이를 보였다(Fig 1).

Tail 내향전류의 최대치에 이르는 시간은 세포마다 다소 차이를 보였으나, 저분극 자극을 주는 시점을 시작점(zero time)으로 하였을 때 두 경우 모두 5~10 ms 사이에서 최고값에 도달하여 세포내 Cl 농도에 따른 유의한 차이는 보기 어려웠다. 그러나 tail 내향전류의 크기가 최대치의 50%로 감소할 때까지의 시간은 K-aspartate 전극용액으로 측정시에는 저분극 자극의 시작으로부터 평균 10~13 ms이고 KCl 전극용액으로 측정

A.



B.

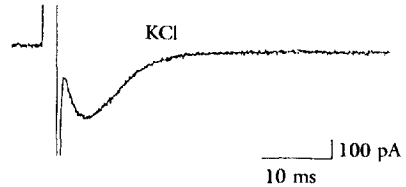


Fig 1. The inward tail current in single atrial cells of the rabbit. The current was recorded during repolarization to -70 mV following a brief 2 ms depolarizing pulse to +40 mV from a holding potential of -70 mV. A was recorded with K-aspartate pipette solution in which chloride concentration was 21 mM. B was recorded with KCl pipette solution in which chloride concentration was 131 mM. The extracellular chloride concentration was 147 mM in both A & B.

하는 경우에는 3~5 ms로 세포내 Cl 농도가 높을 때 훨씬 빠르게 감소하였다. Fig 2는 유지전압 -70 mV에서 +40 mV까지의 저분극 자극을 2 ms 동안 준 다음 여러 막전압으로 재분극시켰을 때 나타나는 전류를 기록한 것이다. 이런 자극양식을 사용하면 전류의 최대 활성화와 그 전압의존도를 알 수 있다. 일과성 외향전류가 저분극 자극에 의해 활성화됨으로써 tail 내향전류 분석에 장애가 되기 때문에 전극용액을 K⁺ 대신 Cs⁺로 채워 다른 K⁺ 전류와 함께 일과성 외향전류를 차단한 후 저분극 자극에 의해 활성화되는 전류를 기록하였다. 이후의 모든 실험에서 전극용액의 K⁺를 Cs⁺로 대체하지 않은 경우에는 세포외 용액에 2 mM 4-aminopyridine을 줌으로써 일과성 외향전류를 억제하였다. Cs-aspartate 전극용액에는 Cl 농도가 21 mM이고, CsCl에는 131 mM인 것 이외에는 두 전극용액에서의 조건은 모두 같았다(실험방법 참조). 전극용액이 Cs-aspartate와 CsCl인 경우에도 K-aspartate와 KCl에

서처럼 tail 내향전류의 크기에 차이를 보였는데, 이러한 차이는 모든 전압 부위에서 나타났다. 두 경우 모두에서 저분극쪽으로 갈수록 내향전류의 크기가 감소되다가 +10 mV 이상에서는 외향전류로 기록되었다(Fig 2A, 2B). 그러나 세포내 Na⁺이 거의 존재하지 않는 본 실험 조건에서 Na-Ca 교환기전에 의한 전류는 전류방향의 역전이 일어날 수 없으므로^{20,21} 여기에서 보이는 전류방향의 역전은 다른 성분의 전류에 의해 나타나는 것으로 볼 수 있다.

세포내 Cl 농도가 높을 때 증가하는 tail 내향전류는 세포내 Cl 농도의 증가와 관련이 있을 것으로 보이므로, 이 tail 전류 성분에 Cl가 직접 관여하는지 보기 위해 Cl 통로 억제제의 효과를 보았다. 음이온 운반체¹와 전압의존성 Cl 전류¹⁷를 억제하는 것으로 알려져 있는 10 μM niflumic acid 및 1 mM bumetanide에 의해 -70 mV에서 기록되는 내향전류가 부분적으로 감소함을 볼 수 있었다(Fig 3). +10 mV에서 외향전류로 기록되는 경우에도 10 μM niflumic acid 및 1 mM bumetanide에 의해 전류가 억제되었다. 그러므로 세포내 Cl 농도를 높였을 때 증가하는 전류의 성분 및 +10 mV 이상에서 외향전류로 기록되는 전류의 성분은 Cl 전류로서 추정되었다.

Tail 전류의 Ca²⁺ 의존성: 이 전류의 Ca²⁺ 의존도를 보기 위해 Ca²⁺ 통로 차단제인 diltiazem 10 μM의 효과를 보았다(Fig 4). 저분극 자극 후 재분극 시의 전압이 -70 mV일 때 기록되는 내향전류(Fig 4A)와 +30 mV일 때 기록되는 외향전류(Fig 4B)는 모두 10 μM diltiazem에 의해 억제되었다. 한편 세포내 근장근들을 억제하는 것으로 알려져 있는 ryanodine⁵을 1 μM 주었을 때의 전극내 용액에 Ca²⁺ buffer인 EGTA의 농도를 10 μM로 전류에서 외향전류로 나타나는 성분 역시 Ca²⁺ 의존성 전류임을 확인하였다(Fig 4B).

세포내 Cl의 증가에 의해 tail 전류의 크기가 증가한 것이 직접 Na-Ca 교환기전이 영향을 받아 Na-Ca 전류의 크기가 커진 것인지, 혹은 다른 성분 전류의 크기가 증가하였는지를 규명하기 위해 Na-Ca 교환전류를 억제하여 보았다. 아직까지 Na-Ca 교환기전에 대해서만 선택적인 억제제가 없으므로³ 세포외 Na⁺ 농도를 낮추어 전기화학적 경사를 감소시킴으로써 Na-Ca 교환전류를 억제하였다^{10,12}, 세포외 Na⁺ 농도를 낮추기 위해서는 NaCl을 LiCl나 N-methyl glucamine chloride (NMG-Cl)로 대체시켜 주었다.

Fig 5A는 세포내 K-aspartate 전극용액에서 세포외 NaCl을 LiCl로 대체시켜 세포외 Na⁺ 농도를 147 mM에서 42 mM로 감소시켰을 때 나타난 tail 내향전류의

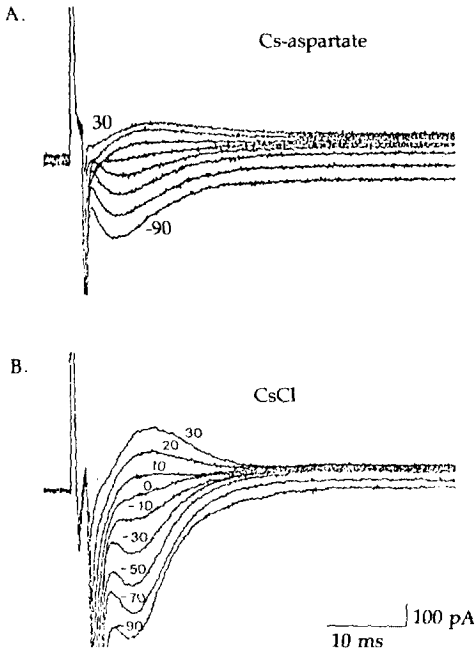


Fig 2. Tail currents recorded at various potentials. The chloride concentration of the pipette solution was 21 mM in A, and 131 mM in B. K⁺ was replaced with Cs⁺ and TEA⁺ in the pipette solution to block voltage sensitive transient outward current. Tail current showed larger magnitude in inward direction at more hyperpolarized potentials and then it reversed at +10 mV in both A and B.

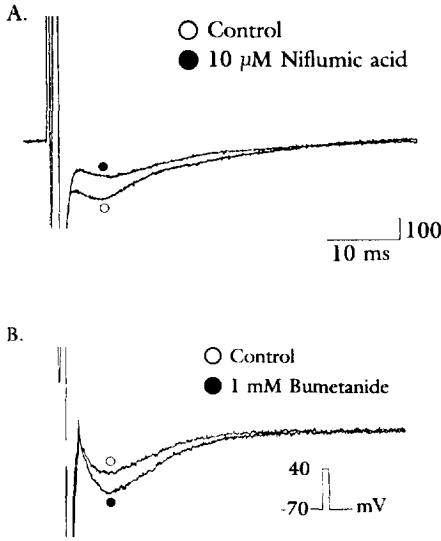


Fig 3. Effects of chloride channel blockers on tail current. K-aspartate internal pipette solution was used. The inward currents recorded at -70 mV were decreased by $10 \mu\text{M}$ niflumic acid(A), bumetanide(B). When the tail currents were recorded at $+10$ mV, outward tail currents were inhibited by chloride channel blockers also.

변화이다. 대조시에 비해 내향전류가 현저히 억제되었음을 볼 수 있다. 이는 세포의 NaCl을 NMG-Cl로 대체시켰을 때도 마찬가지였다. Fig 5B에서는 KCl 전극용액에서 세포의 Na^+ 농도를 감소시켜 tail 내향전류의 변화를 보았다. 세포의 NaCl을 NMG-Cl로 대체시켜 세포의 Na^+ 농도를 147 mM에서 42 mM로 감소시켰을 때 K-aspartate 전극용액에서의 변화와는 달리 tail 내향전류가 감소하지 않고 오히려 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 세포의 Na^+ 을 Li^+ 로 대체시켰을 때도 마찬가지였다. 이때 증가된 tail 내향전류에서 최고치에 도달하는 시간과 비활성화가 느려지는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 세포내 Cl 농도가 높을 때 증가하는 전류의 성분은 Na-Ca 교환전류와는 다른 성분의 전류일 것으로 생각된다. Na-Ca 교환기전에 의한 전류는 세포의 Na^+ 농도가 감소함으로써 억제가 될 것이나 세포내 Ca^{2+} transient는 Na-Ca 교환기전의 억제에 의해 오히려 증가하므로²⁸ 세포의 Na^+ 농도감소에 의해 증가하는 전류는 세포내 Ca^{2+} transient를 반영하는 것으로 보인다.

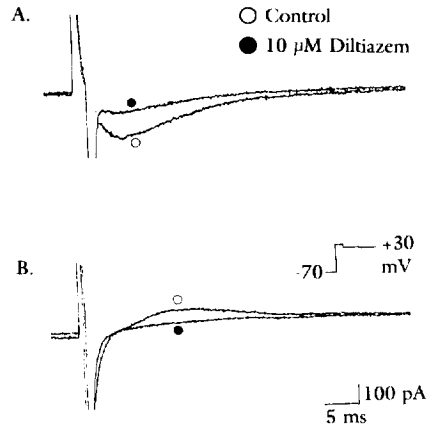


Fig 4. Effects of $10 \mu\text{M}$ diltiazem on the tail currents. The Cs-aspartate pipette solution was used. Both inward component recorded at -70 mV (A) and outward component recorded at $+30$ mV(B) of the tail currents were inhibited by the treatment of $10 \mu\text{M}$ diltiazem. And both currents were abolished by 10 mM EGTA and $1 \mu\text{M}$ ryanodine also.

Fig 6에서는 세포내 Cl 농도에 따른 tail 내향전류의 변화와 함께 tail 외향전류의 변화도 보여 주고 있다. K-aspartate 전극용액과 KCl 전극용액에서처럼 세포의 Na^+ 감소시 Cs-aspartate 전극용액에서는 직접 tail 내향전류가 감소하였고(Fig 6A). CsCl 전극용액에서는 tail 내향전류의 크기가 증가하면서 최고치에 이르는 시간과 비활성화되는 시간이 느려졌다(Fig 6B). -70 mV에서 $+40$ mV까지 2 ms 동안 저분극 시킨 후 $+30$ mV로 재분극시켰을 때 기록되는 외향전류는 세포의 Na^+ 감소시 모두 증가하였으나, Cs-aspartate 전극용액에서는 큰 변화를 보이지 않았으므로(Fig 6C) CsCl 전극용액에서는 그 크기가 증가하였다(Fig 6D).

전류-전압 관계: 유지전압 -70 mV에서 $+40$ mV까지의 저분극 자극을 2 ms 동안 준 다음 여러 막전압으로 재분극시켰을 때 나타나는 전류를 기록하면 KCl 전극용액에서는 -10 mV 부근에서 전류방향의 역전이 나타나고 K-aspartate 전극용액에서는 -30 mV 부근에서 전류방향의 역전이 나타나 세포내 Cl 농도증가에 따라 전류 방향이 역전되는 전압이 보다 저분극 쪽으로 이동

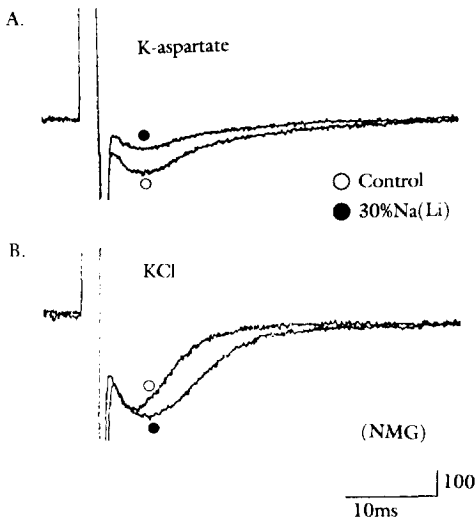


Fig. 5. Effect of extracellular sodium reduction on the inward tail currents. Extracellular NaCl was substituted with LiCl or NMG-Cl. The inward current decreased when K-aspartate pipette solution was used (in A). But the inward current increased when KCl pipette solution was used (in B).

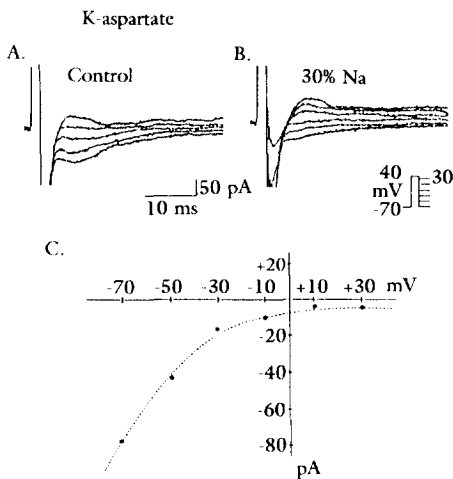


Fig 7. Current-voltage relationship of the Na-Ca exchange current. The difference currents between before (A) and after (B) the reduction of extracellular sodium concentration to 30% were plotted against membrane potential (C). The relationship showed exponential curve and more steeper voltage dependence in more hyperpolarized potentials. 4-Aminopyridine was applied to block voltage sensitive transient outward current.

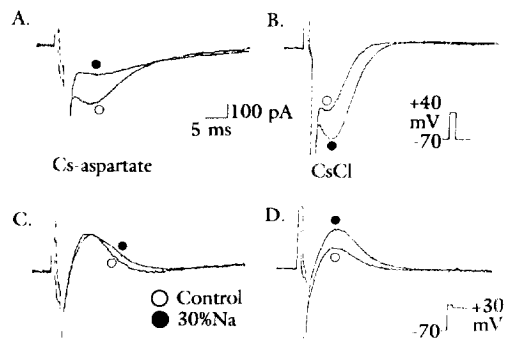


Fig. 6. Effect of the extracellular sodium reduction on inward and outward component of the tail currents. When intracellular Cl was low (Cs-aspartate pipette solution; 21 mM), inward current was decreased (A) by extracellular sodium reduction but increased (B) when intracellular Cl was high (CsCl pipette solution; 131 mM). The outward tail currents were increased remarkably when intracellular Cl was high (D).

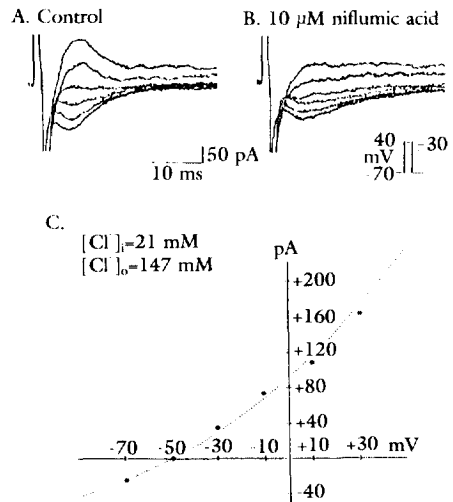


Fig 8. Current-voltage relationship of the niflumic acid sensitive current component recorded with 21 mM Cl⁻ in the pipette. The difference currents between before (A) and after (B) the treatment of niflumic acid were plotted against the membrane potential. The relationship showed outward rectification and the reversal potential at -50 mV. The dotted line is current-voltage relationship of the chloride current according to the constant field equation.

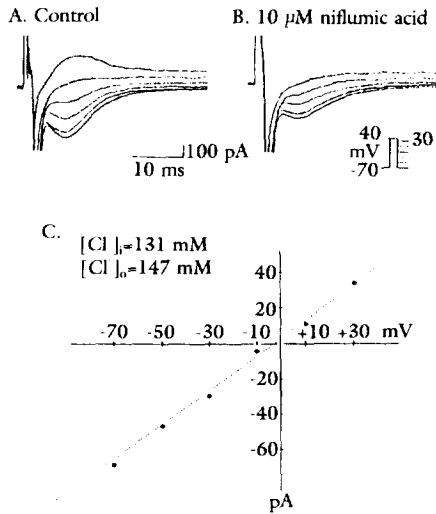


Fig 9. Current-voltage relationship of the niflumic acid sensitive current component with 131 mM Cl in the pipette. 4-Aminopyridine was applied. The tail currents were decreased by 10 μ M niflumic acid (A and B). The current-voltage relationship of the niflumic acid sensitive current showed almost linear and the reversal potential around 0 mV. Such a relationship is well fitted to the theoretically predicted Cl current.

되었다. 세포의 Na^+ 농도가 감소할 때에는 전류방향이 역전되는 전압의 위치가 각각에 대하여 과분극 쪽으로 이동하였다. 그러므로 저분극 자극 후에 나타나는 tail 전류에서 Na-Ca 교환기전에 의한 전류와 다른 성분의 전류를 분리하여 각각에 대한 전류-전압곡선을 구하고 전압의존성 및 역전전압을 구하여 각 전류 성분의 본질을 추구하고 보고자 하였다.

Na-Ca 교환전류에 대한 전류-전압곡선을 구하기 위해서는 전류의 크기를 세포의 Na^+ 농도를 감소시켰을 때 감소하는 tail 전류의 크기를 Na-Ca 교환전류의 크기로 잡고 각각의 막전압에서 그려 보았다 (Fig 7). Na-Ca 교환전류는 과분극 쪽으로 갈수록 크기가 증가하여 막전압에 따라 지수함수적으로 변화를 보였으며, 저분극 쪽으로 갈수록 크기는 감소하였으나 전류방향이 역전은 나타나지 않았다. 이러한 전류-전압 관계는 Na-Ca 교환전류에 대한 이론식과도 잘 맞는 것이었다.

Tail 전류중 Cl에 의해 영향을 받는 전류성분의 크기는 niflumic acid에 의해 감소한 전류의 크기로 추정하였다. Tail 전류는 niflumic acid에 의하여 세포내 Cl가 낮은 경우나 높은 경우에서 내향전류성분과 외향전류

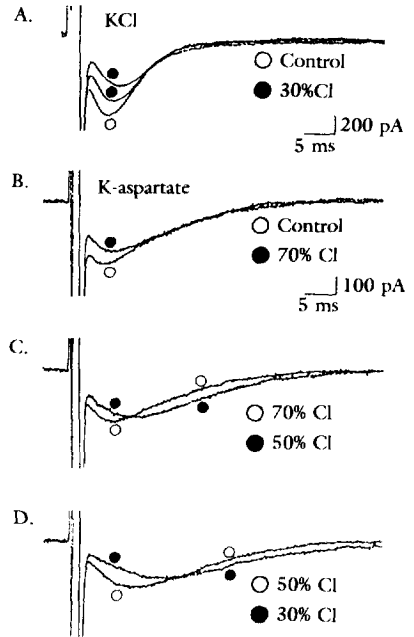


Fig 10. Effect of the extracellular chloride reduction on the tail current. The inward tail currents at -70 mV decreased with both KCl (A) and k-aspartate (B, C, D) pipette solution. In A, the tail current became smaller and slower. In B, C, D, it was smaller and slower according to extracellular chloride concentration decrease.

성분이 모두 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 Cl 농도가 낮은 K-aspartate 전극용액의 경우 외향전류성분의 감소가 현저하고 (Fig 8A, Fig 8B) Cl 농도가 높은 KCl 전극용액의 경우 (Fig 9A, Fig 9B) 내향전류성분의 감소가 뚜렷하였다. K-aspartate 전극용액에 niflumic acid에 의해 감소되는 전류의 전류-전압곡선을 그려 보면 -50 mV에서 전류방향이 역전이 일어나며 전류가 외향으로 흐를 때의 막전도도가 내향으로 흐를 때의 막전도도보다 큰 것을 알 수 있었다 (Fig 8C). 이때 실험 조건과 같이 세포내 Cl 농도를 21 mM, 세포의 Cl 농도를 147 mM로 하여 constant field식¹⁶에 의한 Cl 전류곡선을 구하여 점선으로 나타내었는데, 역전전압의 값이나 전압의존성 등이 실험값과 잘 일치하였다. 세포내 Cl 농도가 높은 KCl 전극용액의 경우 niflumic acid에 의해 감소되는 전류의 전류-전압곡선을 보면 -10 mV 근처에서 전류방향이 역전되며 거의 일직선인 전압의존성을 보였다 (Fig 9C). 이 경우에도 실험조건과

같이 세포내 Cl 농도를 131 mM, 세포외 Cl 농도를 147 mM로 하여 constant field 식¹⁶에 의한 Cl 전류곡선을 구하여 점선으로 나타내었다. 이때의 역전전압값은 -3 mV이고 직선적인 전압의존성을 보임으로써 이론식과 실험값이 잘 일치하였다. 이상의 결과로부터 niflumic acid에 의해 감소하는 전류는 Cl 전류일 것으로 생각된다.

세포외 Cl 농도 감소에 의한 영향: 세포외 Cl 농도의 변화가 tail 전류에 미치는 영향을 보기 위하여 세포외 NaCl 용액을 Na-aspartate나 Na-isethionate로 대체시켜 세포외 Cl 농도를 감소시켜 주었다. Fig 10A는 KCl 전극용액일 경우 isethionate로서 Cl을 대체하여 세포외 Cl 농도를 30%로 감소시켰을 때의 tail 전류의 변화이다. 세포외 Cl 농도를 감소시키에 따라 내향전류가 점차로 감소하였다. 이때 내향전류의 크기가 감소하면서 최대치에 이르는 시간이 늦어짐을 볼 수 있었다. Fig 10B, C, D는 세포내 K-aspartate 전극용액에서

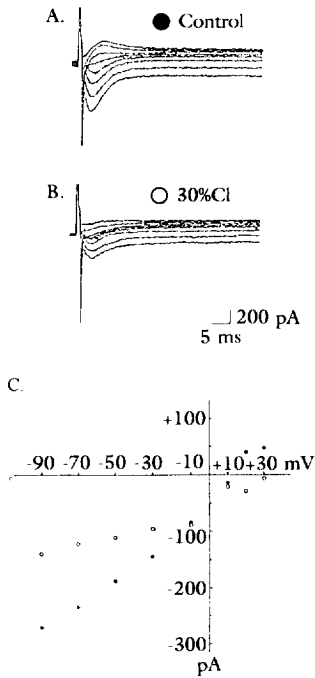


Fig 11. Effect of the extracellular chloride reduction on the voltage dependence of the tail current. The currents were recorded before(A, ●) and after (B, ○) chloride reduction. Current-voltage relationship shows that membrane conductance was reduced in the whole voltage range after chloride reduction(C). Cs-aspartate pipette solution was used.

세포외 Cl를 aspartate로 대체시켜 각각 세포외 Cl 농도를 100%에서 70%로, 70%에서 50%로, 50%에서 30%로 감소시켰을 때의 tail 전류의 변화이다. 세포외 Cl의 농도가 감소할 수록 내향전류의 크기가 감소하고, 최대치에 이르는 시간도 늦어졌다. 이는 세포외 Cl 농도 감소시 Cl 전류의 내향성분이 농도경사에 의해 증가할 것이라는 예상과는 틀린 것이었다. 그러므로 세포외 Cl 감소시의 전류-전압곡선을 구하여 정상 Tyrode 용액 조건에서의 전류-전압 곡선과 비교하여 보았다(Fig 11). 세포외 Cl을 30%로 감소시켰을 때 모든 전압범위에서 막전도가 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 11B, 11C).

앞의 실험결과에서 본것과 같이 tail 전류는 세포내 Ca^{2+} 에 의존적이므로(Fig 4). 이러한 결과가 세포내 Ca^{2+} 농도 변화에 영향을 주는 요인과 관계가 있을 것으로 생각되었다. 이에 세포외 Cl 농도의 변화에 의해 어떠한 요인이 영향을 받는지 보고자 세포외 Ca^{2+} 농도에 의해 영향을 받는 Ca^{2+} 전류를 측정하였다(Fig 12). Ca^{2+} 전류는 유지전압을 -40 mV에서 120 ms의 저분극 자극을 단계적으로 주어 기록하였다. 정상 Tyrode 용액조건에서 Ca^{2+} 전류는 -30 mV에서부터 활성화되며 +10 mV에서 최대값을 보였다. 세포외 Cl 농도를 30% 감소시켰을 때에도 Ca^{2+} 전류는 -30 mV에서 활성화되고 +10 mV에서 최대치를 보여 전압 의존성은 변하지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 Ca^{2+} 전류의 크기는 모든 전압 범위에서 감

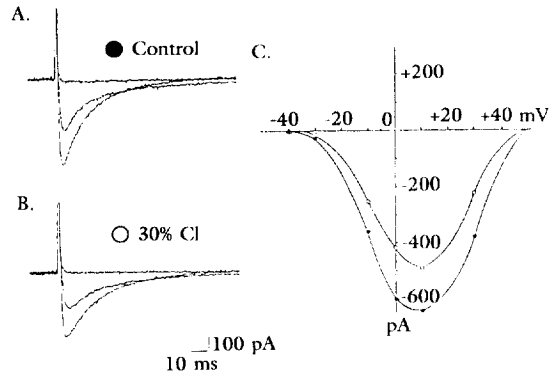


Fig 12. Effect of the extracellular chloride reduction on the calcium current. The calcium was reduced in the whole voltage range(B) after chloride reduction but there was no change in the voltage dependence(○ in C).

소함으로써(Fig 12C) 세포외 Cl^- 농도를 감소시키는 조건에서 세포외 Ca^{2+} 농도가 영향을 받으리라 생각되었다. 이 Ca^{2+} 전류감소에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도증가가 영향을 받는지 보기위해 토끼 심방근 조직 절편으로 수축 실험을 시행하였다. 그 결과 세포외 Cl^- 농도감소시 수축의 크기가 크게 감소하였다.

고 찰

Ca^{2+} 전류를 활성화시키는 저분극 자극 후 재분극을 시킬 때 나타나는 느린 내향 전류(tail current)는 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 의해 활성화되고 세포외 Na^+ 농도에 의존성을 보이는 Na-Ca 교환기전으로 생각되고 있다^{10,20,21}. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 심장에서의 교환기전은 Na^+ 세개와 Ca^{2+} 한개를 교환함으로써 전류를 발생하며, 정상 상태에서는 주로 내향 방향으로 이동이 일어나 세포내 Ca^{2+} 농도를 낮게 유지 시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{6,24,25}. 그러므로 세포내 Ca^{2+} 농도 증가에 의해 활성화된 이 전류의 감소(decay)는 세포내 Ca^{2+} 농도가 안정상태로 돌아오면서 Na-Ca 교환기전의 활동도가 항상상태로 돌아오는 것을 반영한다고 볼 수 있다^{24,14}. 또한 이 전류를 측정함으로써 세포밖으로 배출되는 Ca^{2+} 의 양을 추정할 수 있을 것으로 생각된다¹⁴.

그러나 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 Na-Ca 교환기전 뿐만 아니라 세포내 Ca^{2+} 증가시 선택적으로 열리는 K^+ 통로, 비선택적 양이온통로⁷, Cl^- 통로¹ 등을 동시에 활성화시킬 수 있다. 그러므로 저분극 자극 후 활성화되는 tail 전류에는 Na-Ca 교환전류 이외에도 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 다른 성분이 있을 가능성이 있다. 실제로 심장이 아닌 다른 조직 세포에서 저분극 자극 후에 기록되는 전류(tail current)는 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 Cl^- 전류라는 보고가 있다^{26,27}. 이 전류의 기능적 역할에 대하여는 잘 알려져 있지 않으나 쥐의 신경 세포에서는 막전압을 활동전압 역치 이하로 재분극시키도록 촉진하고 일정 수준에서 유지시키는 역할을 하는 것으로 생각되고 있다²⁶. 그러나 평활근 세포에서는 이 전류가 안정막 전압 부근에서 내향성 전류로서 저분극을 유발하는 것으로 보고 되었다²⁷.

본 실험에서 저분극후에 기록되는 tail 전류는 과분극 될수록 크기가 증가하는 내향전류로서 나타났으나 +10 mV에서 전류의 방향이 역전되어 그 이상의 저분극에서는 외향전류로서 나타났다(Fig 2). 본 실험의 조건에서 순수한 Na-Ca 교환기전에 의한 전류는 역전전압 값

이 +130 mV이므로 outward로서 나타나는 전류는 tail 전류의 다른 성분에 의한 것으로 생각되었다. 막전압을 -70 mV에서 고정시켜 내향전류로서 나타날 때와 +30 mV에서 외향전류로서 나타날 때의 tail 전류는 모두 Ca^{2+} 통로 억제제인 10 μM diltiazem과 SR 억제제인 1 μM ryanodine, 세포내 Ca^{2+} 증가를 억제하는 고농도의 EGTA(10 mM)에 의해 소실되었다(Fig 4). 이러한 결과는 외향전류로서 나타날 수 있는 tail 전류의 성분도 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 전류라는 것을 보여준다. Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 Cl^- 전류가 tail 전류에 관여하는지 보기위해 tail current에 대한 Cl^- 농도변화의 영향을 관찰하였다. 본 실험의 세포밖 Cl^- 농도는 147 mM이었으며 실험시 온도는 37°C로 유지시켰다. 전극속(세포내 이온농도를 반영) Cl^- 농도를 21 mM로 하였을 때는 -70 mV에서의 내향전류 크기의 최고값은 -100에서 -300 pA의 범위에 있었다. 세포내 Cl^- 농도를 -131 mM로 하였을 때는 -70 mV에서의 내향전류 최고값이 -400에서 -600 pA 범위에 있었다(Fig 1). 이러한 세포내 Cl^- 농도에 따라 전류의 크기가 차이를 보이는 것은 세포내 관류법(intracellular perfusion technique)을 실시하여 한 세포내의 Cl^- 농도를 직접 증가시켰을 때의 전류변화를 측정하여 tail 전류크기의 증가가 Cl^- 농도변화에 의한 직접적인 것임을 확인하였다. 저분극 자극 후에 활성화되는 tail 전류에 세포내 Ca^{2+} 농도에 의존적인 Cl^- 전류가 존재한다면 세포내 외의 Cl^- 농도경사에 따라 내향전류의 크기가 변할 것이다. 그러므로 세포외 Cl^- 농도가 낮을수록 내향전류로의 크기는 커질것으로 기대된다. 그러나 세포내 Cl^- 농도와는 상관없이 세포외 Cl^- 농도가 낮을수록 그 크기가 감소되며 시간경과도 느려졌다(Fig 10). 이때의 전류-전압곡선은 정상 Tyrode 용액에서의 전류-전압곡선에서보다 전체적으로 막전도도가 감소하였다. 기대결과와는 달리 내향전류 성분이나 외향전류 성분 모두가 감소되어 전체적으로 전류의 활성화가 저하되는 것으로 생각되었다(Fig 11). 이 전류는 세포내 Ca^{2+} 의존적인 전류이므로, 세포내 Ca^{2+} 농도에 영향을 주는 요소에 의하여 영향을 받으리라 생각되므로 Ca^{2+} 전류를 측정하여 보았다. 세포외 Cl^- 농도 감소시 측정된 Ca^{2+} 전류는 전압의존성에는 변화가 없었으나 그 크기는 감소하였다(Fig 12). 이제까지의 보고¹⁸를 보면 세포외 Cl^- 농도를 감소시키기 위해 Cl^- 대신 사용하는 대체물들이 Ca^{2+} 와 결합하여 세포외의 Ca^{2+} 농도를 감소시킬 수 있다고 되어 있다. 이 경우에도 세포밖 Cl^- 농도를 감소시켰을 때 Ca^{2+} 전류가 감소되는 것은 세포외 Ca^{2+} 농도 감소에 의한 이차적인 것으로 볼 수 있다. 이 Ca^{2+}

전류의 감소에 의해 세포내 Ca^{2+} 농도가 영향을 받는지 보기 위해 토끼 심방근의 조직 절편을 사용하여 세포외 Cl 감소시 수축의 변화를 보았다. 그 결과 세포외 Cl 농도 감소시 수축의 크기가 많이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 세포외 Cl 농도 감소시에 나타나는 내향전류의 감소는 세포내 Ca^{2+} 농도(Ca^{2+} transient) 감소에 의해 전류의 활성화가 저하되기때문인 것으로 생각된다.

Cl 농도에 따라 tail 전류의 크기가 변화하는 결과로부터 두가지 가능성을 생각하였다. 하나는 세포내 Cl 이 Na-Ca 교환기전에 조절자(modulator)로서 관여할 가능성이고, 다른 하나는 tail 전류의 성분으로서 Cl 전류가 존재할 가능성이다. 본 실험의 HCO_3^- 가 없는 조건에서는 Cl 농도변화가 HCO_3^- -Cl 교환기전에 영향을 미쳐 세포내 pH를 변화시켰을 가능성³⁰은 배제되었다. Cl 농도변화에 따르는 junction potential의 변화에 의한 영향은 실험에서 고농도의 KCl agar bridge를 사용함으로써 배제되었다. 첫번째 가설은 세포외 Na⁺ 농도감소로서 Na-Ca 교환기전의 driving force를 감소시켰을 때의 실험으로부터 배제되었다. 세포외 Na⁺를 Li⁺ 또는 N-methyl-D-glucamine으로 대신시켜 30%로 감소시켰을 때 -70 mV에서 기록되는 tail 내향전류의 크기는 세포내 Cl 농도가 21 mM일 때는 현저하게 감소했으나 세포내 Cl 농도가 131 mM로 높은 조건에서는 오히려 증가되었으며, 또한 그 시간경과도 느리게 되었다(Fig 5). Tail 외향전류에서도 세포외 Na⁺ 감소에 의해 tail 전류가 증가하였는데 세포내 Cl 농도가 낮을 때보다 세포내 Cl가 높을 때 더 큰 증가를 보였다(Fig 6). 세포내 Cl 농도가 높은 조건에서 오히려 tail 전류의 크기가 증가하는 것은 Na-Ca 교환기전에 대한 driving force가 감소된 조건에서는 다른 성분의 증가로만이 설명이 되며, 증가한 부분은 Na-Ca 교환기전 억제에 의해 증가된 세포밖으로 퍼내지 못한 Ca^{2+} 에 의해 활성화된 것으로 생각되었다.

두번째 가설을 검증하기 위해 Cl 통로 억제제를 사용하였다. Tail 전류는 1 mM bumetanide와 10 μ M niflumic acid에 의해 부분적으로 억제되었다(Fig 3). Cl 통로 억제제에 의한 tail 전류의 감소효과는 세포내 Cl 농도가 21 mM일 때는 외향전류로 기록될 때의 감소효과가 내향전류로 기록될 때의 감소효과보다 더 현저하였다. 이는 tail 전류의 Na-Ca 교환전류 성분이 주로 내향전류로서 존재하는 사실과 잘 부합된다. Tail 전류에서 niflumic acid에 의해 억제된 전류의 크기로서 전류-전압 곡선을 구하였을 때, niflumic acid에 의해 억제된 전류는 outward rectification을 보였으며, 역전전

압은 -50 mV였다(Fig 8). 이 전류-전압 곡선은 constant field equation에 의해 구하여진 Cl 전류의 전류-전압곡선과 잘 일치하였다¹⁶. 세포내 Cl 농도를 세포밖의 Cl 농도와 비슷한 농도인 131 mM로 높였을 때 기록된, tail 전류에서의 niflumic acid에 의해서 감소한 부분의 전류-전압 관계는 거의 linear 한 관계를 보였으며, 역전전압도 0 mV 근처에서 나타났다(Fig 9). 이러한 관계는 이론적으로 실험과 같은 세포내외의 Cl 농도경사시 추정되어진 Cl 전류의 전류-전압 곡선과 잘 일치하였다¹⁶. 이러한 결과들은 tail 전류에서 niflumic acid에 의하여 억제된 성분의 전류가 Cl 전류를 잘 설명해 주고 있다.

본 실험의 결과들로부터 세포내 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 tail 전류에는 Na-Ca 교환전류 및 Cl 전류가 관여함을 알 수 있다.

저분극 자극 후에 활성화되는 tail 전류와 세포내 Ca^{2+} 를 동시에 측정된 실험의 결과들로부터 tail 전류는 생리적 상태에서 세포내 Ca^{2+} transient를 가장 신속하게 그리고 정량적으로 제시하는 자료로 보고있다¹⁵. Tail 전류에 관여하는 Na-Ca 교환전류 및 Ca^{2+} 의존성 Cl 전류는 각각의 전류-전압관계로 부터 과분극 쪽에서는 Na-Ca 교환전류에 의한 내향성분의 전류가 우세하며, 저분극 쪽에서는 Ca^{2+} 의존성 Cl 전류에 의한 외향성분의 전류가 우세함을 볼 수 있다. 그러므로 Na-Ca 교환기전에 의한 내향전류는 세포내 Ca^{2+} 을 세포밖으로 배출하는 역할을 하며 Ca^{2+} 의존성 외향전류는 활동전압의 재분극을 촉진하여 더 이상의 Ca^{2+} 유입을 억제함으로써 tail 전류는 세포내 Ca^{2+} transient를 반영하는 동시에 세포내 Ca^{2+} 를 낮게 유지하는데 기여하는 전류로 볼 수 있다.

결론

토끼의 단일 심방근 세포에서 단일세포 막전압 고정법(whole cell clamp method)을 이용하여 +40 mV, 2 ms의 자극 후에 활성화되는 tail 전류를 기록하고, 이 전류의 전압의존도와 Cl이 이 전류에 미치는 영향을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. -70 mV에서 기록되는 내향전류는 세포내 Cl 농도에 따라 다르게 나타났는데, 세포내 Cl 농도가 높을수록 내향전류의 크기가 증가하고 시간경과도 빠르게 나타났다.
2. 세포외 Na⁺ 감소에 의한 Na-Ca 교환전류의 억제 효과는 세포내 Cl 농도에 따라 다르게 나타났다. 세포

내 Cl 농도가 낮을 때는 Na-Ca 교환전류가 억제되어 내향전류의 감소가 뚜렷하였으나 세포내 Cl 농도가 높을 때는 내향전류의 감소가 나타나지 않았다.

3. 저분극 자극 후에 활성화되는 전류는 Ca^{2+} 통로 억제제인 10 μM diltiazem과 근장그물의 기능을 억제하는 1 μM ryanodine에 의하여 억제되었다.
4. 음이온 운반체 억제제인 niflumic acid 10 μM 및 1 mM bumetanide에 의하여 전류가 억제되었다. 세포내 Cl 농도가 낮을 때는 외향성분이 주로 억제되고, 세포내 Cl 농도가 높을 때는 내향성분과 외향성분 모두 억제되었다.
5. Niflumic acid에 의해 감소된 전류를 바탕으로 그린 전류-전압곡선에서 역전전압값은 Cl의 평형전압값과 일치하였으며, 세포내 Cl 농도가 증가하였을 때는 Cl 평형전압값의 이동방향으로 역전전압값이 변하였다.

이상의 실험 결과들로부터 토끼 심방근 세포에서 짧은 저분극 자극 후에 활성화되는 전류에는 Na-Ca 교환전류 이외에도 세포내 Ca^{2+} 농도증가에 의해 활성화되는 Cl 전류가 존재함을 알 수 있다. 이 전류는 세포내 Ca^{2+} transient를 반영하며 세포내 Cl 농도가 낮은 생리적 상태에서는 주로 외향전류 성분으로서 작용하여 활동전압의 재분극을 촉진하여 더이상의 Ca^{2+} 유입을 억제함으로써 Na-Ca 교환전류와 함께 세포내 Ca^{2+} 을 낮게 유지하는 역할에 관여하리라 생각된다.

참고 문헌

1. Bader CR, Bertrand D, Schlichter R. Calcium-activated chloride current in cultured sensory and parasympathetic quail neurons. *J Physiol* 1987; 394: 125~148.
2. Barceñas-Ruiz L, Wier WG. Voltage-dependence of $[Ca^{2+}]_i$ transients in guinea-pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1987; 61: 148~154.
3. Bielefeld DR, Hadley RW, Vassilev PM, et al. Membrane electrical properties of vesicular Na-Ca exchange inhibitors in single atrial myocytes. *Circ Res* 1986; 59: 381~389.
4. Cannell MB, Berlin JR, Lederer WJ. Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* 1987; 238:

1419~1423.

5. Chamberlain BK, Volpe P, Fleischer S. Calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles: general characteristics. *J Biol Chem* 1984; 259: 7540~7546.
6. Chapman RA. Control of cardiac contractility at the cellular level. *Am J Physiol* 1983; 245: H353~552.
7. Copquhoun D, Neher E, Reuter H, et al. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 1981; 294: 752~754.
8. DiFrancesco D, Noble D. A model of cardiac electrical activity in incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philosophical Trans Royal Soc* 1985; B307: 353~398.
9. Earm YE, Ho WK, So IS. An inward current activated during late low-level plateau phase of the action potential in rabbit atrial cells. *J Physiol* 1989; 410: 49P.
10. Earm YE, Ho WK, So IS. Inward current generated by Na-Ca exchange during the action potential in single atrial cells of the rabbit. *Proc Soc Lond* 1990; B240: 61~81.
11. Gerstheimer FP, Muhleisen M, Nehring D, et al. A chloride/bicarbonate exchanging anion carrier in vascular smooth muscle of the rabbit. *Pflugers Arch* 1987; 409: 60~66.
12. Giles W, Shimoni Y. Slow inward tail current in rabbit cardiac cells. *J Physiol* 1989; 417: 447~463.
13. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv* 1981; 395: 6~18.
14. Hilgemann DW. Extracellular calcium transients and action potential configuration changes related to post-stimulatory potentiation in rabbit atrium. *J Gen Physiol* 1986; 87: 675~706.
15. Hilgemann DW, Noble D. Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transient in rabbit atrium; reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc R Soc Lond* 1987; B230: 163~205.
16. Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. 1984; 230~237. Sinauer, Sunderland.
17. Inoue I. Voltage dependent chloride conductance of the squid axon membrane and its blockade by some disulfonic stilbene derivatives. *J Gen Physiol*

- 1985; 85: 519~537.
18. Kenyon JL, Gibbons WR, Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979; 73: 117~138.
 19. Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1987; 384: 199~222.
 20. Lipp P, Pott L. Transient inward current in guinea-pig atrial myocytes reflects a change of sodium exchange current. *J Physiol* 1988a; 397: 601~630.
 21. Lipp P, Pott L. Voltage dependence of sodium-calcium exchange current in guinea-pig atrial myocytes determined by means of an inhibitor. *J Physiol* 1988b; 403: 355~366.
 22. Mechmann S, Pott L. Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 1986; 319: 597~599.
 23. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, et al. The effects of ryanodine, EGTA and low-sodium on action potentials in rat and guinea-pig ventricular myocytes; evidence for two inward currents during the plateau. *British J Pharmacol* 1984; 81: 543~550.
 24. Mullins LJ. *Ion Transport in Heart*. 1981; New York: Raven Press.
 25. Noble D. Sodium-calcium exchange and its role in generating electric current. In *Cardiac Muscle: The Regulation of Excitation and Contraction*, ed. Nathanm RD. 1986; 171~198. New York: Academic Press.
 26. Owen DG, Segal M, Barker JL. A Ca^{2+} -dependent Cl⁻ conductance in cultured mouse spinal neurones. *Nature*. 1984; 311: 567~570.
 27. Pacaud P, Loirand G, Lavie JL, et al. Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch* 1989; 413: 629~636.
 28. Park CO, So IS, Ho WK, et al. Effect of the changes in Ca-current and intracellular Ca-concentration on the contraction and action potential staircase. *Korean J Physiol* 1989; 23(2): 301~312.
 29. Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentration. *J Physiol* 1967; 192: 479~492.
 30. Vaughan-Jones RD. Regulation of chloride in quiescent sheep-heart purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. *J Physiol* 1979; 295: 111~137.
-