

## GS-386이 단일 심근 세포의 $Ca^{2+}$ 전류에 미치는 효과

박춘옥 · 장경재 · 김양미 · 한재희 · 홍성근

경상대학교 의과대학 생리학교실, 심혈관연구소  
(1993년 10월 18일 접수)

### Effects of GS-386 on the calcium current in rabbit atrial myocytes

Choon-ok Park · Kyeong-jae Chang · 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 effects of the novel compound GS-386 on the calcium current were investigated in rabbit atrial myocytes. The calcium current was recorded during various depolarizations of 200 ms duration from a holding potential of -40 mV using the whole cell patch clamp technique.

The calcium current was activated from -30 mV, reached maximum amplitude at +10 mV and almost disappeared at +50 mV. Superfusion of GS-386 led to a reduction of the calcium current amplitude dose-dependently and  $ED_{50}$  was  $2.5 \times 10^{-7}$  M. But the dependence of the calcium current on the membrane potential was not altered by GS-386. The inactivation of the calcium currents showed single exponential curves in both before and after application of GS-386. The inactivation time constants before and after application of GS-386 were almost the same (35 ms and 32.5 ms). The steady-state inactivation curve of the calcium current was not shifted by GS-386. The calcium currents both before and after application of GS-386 recovered completely in 1 sec and the recovery time constants were about 200 ms in both cases.

From the above results it is concluded that the novel compound GS-386 has calcium antagonistic property decreasing the calcium current.

**Key words:** calcium current, whole cell patch clamp, rabbit atrial myocytes, calcium channel blocker

## 서 론

$Ca^{2+}$  통로(calcium channel)는 근육수축, 호르몬과 신경전달물질의 분비,  $Ca^{2+}$  의존적인 단백질에 의해 조절되는 대사과정 등의 많은 중요한 세포기능에 관여하고 있으며, 특히 심장에서는 심근의 수축력 및 심박수의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>29,30,37</sup>. 이러한 이온 통로들은 주로 세포막전압의 변화나 화학물질에 의해서 투과성이 변화하게 되며<sup>31</sup>, 세포내 이차전령에 의한

이온통로의 인산화 과정등 세포내 조절기전들에 의해서 투과성이 조절된다<sup>4,13,30</sup>.

$Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$  전류(calcium current)의 조절을 목적으로 무기이온인  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  및  $La^{3+}$  등이 사용되어 왔으나<sup>13</sup>, 이들은 실험실에서의 연구에는 유용하나 실제로 생체에서의 실험에는 이용할 수 없었다. 이에 유기물질인  $Ca^{2+}$  길항제에 대한 연구가 이루어져, 이 계통의 첫번째 개발품인 verapamil이 1964년 Fleckenstein에 의하여 소개되었고, 이것은  $Ca^{2+}$

유입을 선택적으로 막아  $Ca^{2+}$  전류를 줄인다는 사실이 입증되었다<sup>15</sup>. 그후 20년동안 많은  $Ca^{2+}$  길항제가 개발되어 왔는데 대표적인 것으로 phenylalkylamine계인 verapamil, 1,4-dihydropyridine계인 nifedipine, benzodiazepine계인 diltiazem 등이 있다<sup>34,39</sup>. 고전적인 전기생리학적 연구에 의하면 서로 다른 계에 속하는  $Ca^{2+}$  길항제는  $Ca^{2+}$  통로에 대한 작용양상이 거의 유사하나 verapamil 등은 그 효과가 반복자극시 그 억제기전이 더욱 강화되는(frequency dependency) 것을 볼 수 있으며 nifedipine 등은 이러한 특징적 양상을 관찰할 수 없는 등의 차이가 있음을 알게 되었다<sup>20</sup>. 최근에는 dihydropyridine 계통이지만 오히려  $Ca^{2+}$  전류를 증가시키는 약물들이 새롭게 발견되었으며<sup>2,7,10,7,33,36</sup>, 이러한 약물들은  $Ca^{2+}$  통로를 이해하는 중요한 도구로 사용되고 있다.  $Ca^{2+}$  길항제에 대한 연구는 이제까지 주로 혈관이나 심장의 조직에서 이루어져 왔는데, 몇몇 약물들이 보이는 조직에 대한 선택성은 조직의 수용체에 대한 특이성에 의한 것인지, 혹은  $Ca^{2+}$  통로의 조절방식에 있어서 조직에 따른 전압의존성의 차이 때문인지, 혹은 약력동학적(pharmacokinetics) 차이에 의한 것인지 아직까지 의문시되고 있다<sup>39</sup>.

$Ca^{2+}$  길항제에 대하여는 매우 많은 연구가 되어 있으며, 현재 실제로 임상에서 환자에게 사용되고 있다. 그럼에도 새로운  $Ca^{2+}$  길항제의 개발이 계속 요구되는바, 이는 보다 치료의 목적에 적합한 역가(potency), 작용지속시간(duration of action), 조직의 선택성(tissue selectivity) 등을 갖추므로써 부작용을 줄이고 치료의 효과를 높이기 위함이다. 최근 국내의 국립 경상대학교 약리학 교실에서는 새로운 합성체인 GS-386을 개발하여 조직실험을 실시한 바 있다. 여러 다른 조직에서의 실험결과 GS-386은  $Ca^{2+}$ 이 매개되는 생물학적 현상들을 억제함으로써  $Ca^{2+}$  길항제의 특징을 가지고 있는 것으로 생각되고 있다.

최근까지 심근세포에서의  $Ca^{2+}$  전류에 대한 연구는 심근이 특이한 다세포로서의 복잡한 구조를 가지며 막전류 중에서  $Ca^{2+}$  전류만을 독립적으로 분리하는 것이 대단히 어려웠기 때문에 난관이 많았으나<sup>20</sup>, collagenase를 이용한 단일 심근분리법에 의해 막전압을 균등하게 조절할 수 있게 되었다<sup>12</sup>. 따라서 본 연구에서는 심근조직을 단일 심근세포로 분리하여 심근에서의 GS-386의 효과를  $Ca^{2+}$  전류를 관찰하여 좀더 정확하게 분석하며, 나아가  $Ca^{2+}$  통로에 대한 이해를 돕고자 하였다.

**단일 심근세포의 분리:** 토끼의 단일 심방근 세포의 분리 방법은 Earm 등<sup>5</sup>의 방법을 사용하였다. 1Kg 내외의 토끼에 마취제(Ketamine 25 mg/Kg, Rompun 10 mg/Kg : 정주)와 항응고제(heparin 1000IU/Kg;정주)를 투여한 후, 대동맥에 cannula를 삽입시키고 심장을 적출하여 Langendorff 장치에 연결하여 관상동맥을 통하여 collagenase가 포함된  $Ca^{2+}$ -free Tyrode 용액을 15분~20분 정도 관류시켰다. 심방부분을 떼내서 잘 흔든 다음 떨어져 나온 세포들을 low Cl, high K<sup>+</sup> 용액에 넣어서 4℃에서 보관하였으며, inverted microscope에 설치된 실험용기로 옮긴 후 37℃에서 실험하였다.

**실험용액:** 실험에 사용한 정상 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES(N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 5 mM, glucose 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM이고 pH는 NaOH로 적정하여 7.4로 맞추었다.

전극을 채우는 용액(internal solution)은 Cs-aspartate 110 mM, Mg-ATP 5 mM, di-Tris creatine phosphate 2.5 mM, disodium creatine phosphate 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, TEA-Cl (tetraethyl-ammonium chloride) 20 mM, EGTA (ethylene-glycol-bis-(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetra-acetic acid) 5 mM의 조성을 가진 것을 사용하였으며, pH는 CsOH로 적정하여 7.4로 맞추었다.

**Patch clamp 방법:** 단일 심근세포를 대상으로 patch clamp 증폭기를 사용하여 whole cell clamp 방법<sup>8</sup>으로 기록하였다. Patch 전극은 borosilicate capillary(내경 1 mm)를 두번 뽑아 전극저항이 2~3 MΩ되는 것을 사용하였다.

토끼의 단일 심방근세포에서  $Ca^{2+}$  전류를 기록하기 위하여는 -40 mV의 유지전압에서 30초마다 10 mV 간격으로 저분극 자극을 200 ms의 길이로 주었다.  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$  전류만을 순수하게 기록하기 위해서 다른 이온전류들을 억제하였다. Na<sup>+</sup> 전류를 억제하기 위해서 대부분의 경우에 -40 mV의 유지전압(holding potential)하에서 실험을 하였으며, -60 mV의 유지전압에서 항정상상태 비활성화(steady-state inactivation) 실험을 할 경우에는 10 μM TTX(tetrodotoxin)를 사용해서 Na<sup>+</sup> 전류를 억제하였다. 여러 종류의 K<sup>+</sup> 전류들을 억제하기 위해서 Cs<sup>+</sup>을 주성분으로 하는 전극내 용액(internal solution)을 사용하였으며, 세포내  $Ca^{2+}$  의존적인 일과성 외향전류(transient outward current) 및 Na-

Ca 교환전류(Na-Ca exchange current)를 억제하기 위하여 5 mM의 EGTA가 포함된 전극내 용액을 사용하였다<sup>14,24</sup>. 또한 막전압 의존적인 일과성 외향전류를 억제하기 위하여 Tyrode 용액에 1 mM의 4-aminopyridine을 추가하여 사용하였다<sup>35</sup>.

**실험성적의 기록:** Patch clamp 증폭기(EPC-7, List Electronics)를 통한 실험성적은 digital oscilloscope (Hitachi, 6041)와 생리기록기(Gould, 220)로 관찰하면서 동시에 PCM data recorder(Medical system)에 저장하였으며, X-Y Plotter(Graphtec, MP 4100)에 재생하여 분석하였다.

## 결 과

**Ca<sup>2+</sup> 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup> 전류의 분리:** Fig 1은 토끼의 단일 심방근세포에서 Ca<sup>2+</sup> 전류를 기록한 것이다. Fig 1A는 -40 mV의 유지전압에서 30초마다 10 mV 간격으로 -30 mV에서 +10 mV까지의 저분극 자극을 200 ms의 길이로 주었을 때 기록된 Ca<sup>2+</sup> 전류이며 Fig 1B는 +10 mV에서 +50 mV까지의 자극을 주었을 때 기록된 것이다. Fig 1C는 각 전압에서 발생하는 Ca<sup>2+</sup> 전류의 최대치를 얻어서 그린 전류-전압 곡선(I-V curve)이다.

토끼의 단일 심방근 세포에서 기록된 Ca<sup>2+</sup> 전류는 -30 mV부터 활성화되어 +10 mV에서 최대값을 보이고 +50 mV에서 거의 소실되는, 종 모양(bell-shape)의 전류-전압 곡선을 보였다. Ca<sup>2+</sup> 전류의 최대값은 세포의 크기와 상태에 따라 달랐지만 평균 400 pA 정도였으며, 자극 후 2~5 ms에서 최대값을 보이고 100 ms 이내에 완전히 비활성화되었다. Ca<sup>2+</sup> 전류의 비활성화는 단일 지수합수곡선(single exponential curve)에 잘 맞았으며, 비활성화 시간상수(time constant of inactivation)는 10~20 ms였다. 또한 Ca<sup>2+</sup> 전류의 회복 시간상수(recovery time constant)는 200 ms 정도였다. 이러한 결과들은 단일 세포를 대상으로 실험한 다른 연구자들의 결과와 거의 비슷하였다<sup>11,12,19,23,27</sup>.

**GS-3860이 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기에 미치는 영향:** 다음은 Ca<sup>2+</sup> 전류의 크기에 미치는 GS-386의 효과를 관찰하여 보았다. GS-386은 물에 녹을 수 있는 성질을 가지므로 세포의 용액에 첨가하여 사용하였다. Fig 2A는 0.15 μM GS-386 투여시 Ca<sup>2+</sup> 전류의 변화이다. 세포의 용액을 GS-386이 있는 용액으로 바꾸어 준 후 전류의 크기가 감소하기 시작하였으며, 감소된 전류의 크기는 2분 후에 항정상태에 이르렀다. 그러므로 변화된 전류 크기

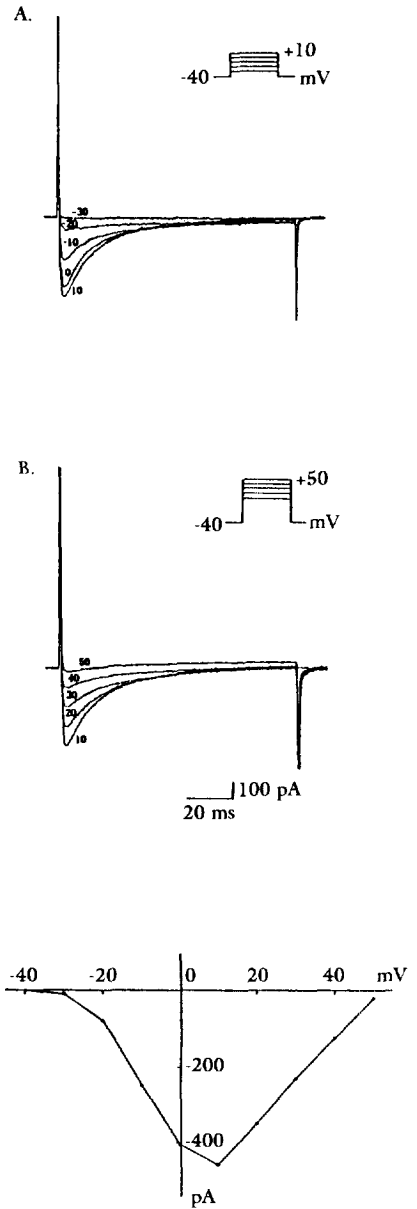


Fig 1. Ca-currents in single atrial cell of the rabbit. The holding potential was -40 mV. A: the activation of Ca-currents by clamp pulses from -30 mV to +10 mV for 200 ms. B: Ca-currents by clamp pulses from +10 mV to +50 mV. C: The current-voltage relationship for the Ca-currents. The I-V curve of the Ca-currents shows typical bell-shape appearance with maximum activation at +10 mV.

의 비교는 용액을 바꾼 후 4분 뒤에 기록된 전류의 것과 하였다. GS-386에 의해 전류의 크기가 감소하였으나 전류가 비활성화되는 모습은 대조전류에서처럼 단일 지수함수적 곡선을 보였다. 비활성화 시간상수는 32.5 ms로서 대조전류에서의 35 ms와 거의 차이를 보이지 않았다. Fig 2B에서는 0.5  $\mu\text{M}$ 로 GS-386의 농도를 높였을 때 전류의 크기가 더욱 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러므로  $\text{Ca}^{2+}$  전류는 GS-386에 의해 농도의존적으로 억제됨을 알 수 있으며, GS-386에 의해 심장 수축력이 감소하는 것은  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 감소와 관계가 있을 것으로 생각된다.

Fig 3에서는  $\text{Ca}^{2+}$  전류에 대한 GS-386의 용량 반응 관계를 살펴보았다. Fig 3A로부터는 한 세포에서 GS-386의 농도에 따라  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 크기가 변화하는 것을 볼 수 있다. 각각의 전류의 기록은 대조시와 GS-386의 농도를 0.15  $\mu\text{M}$ , 0.2  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ 로 올

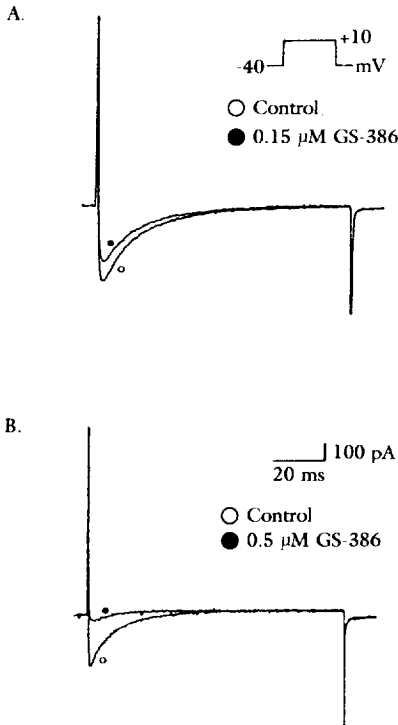


Fig 2. Effects of the novel compound GS-386 on the current. The holding potential was -40 mV and the clamp pulse was +10 mV for 200 ms. A: Ca-current was decreased with the application of 0.15  $\mu\text{M}$  GS-386(●). B: Ca-current was almost abolished by 0.5  $\mu\text{M}$  GS-386(●).

려주었을 때 기록된 것이다. GS-386의 농도 변화에 대하여  $\text{Ca}^{2+}$ 전류의 크기변화 비율의 용량-반응 곡선을 구하여 본 결과(Fig 3B), GS-386의 농도가 0.25  $\mu\text{M}$ 일때  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 크기가 50%로 감소하였으며 1  $\mu\text{M}$  이상에서는 전류가 거의 소실되었다. 앞으로의 모든 실험에서는 GS-386이  $\text{Ca}^{2+}$  통로에 대해 미치는 영향을 관찰하기 위하여 부분적으로 전류를 억제하는 농도인 0.15  $\mu\text{M}$ 에서 실시하였다.

GS-386이  $\text{Ca}^{2+}$  전류의 전압의존성에 미치는 영향: 다음은  $\text{Ca}^{2+}$  전류에 대한 GS-386의 효과가 실제적인 전류 크기의 감소인지 아니면 단순한 전압의존도의 변화인지를 관찰하기 위하여 전류-전압 관계를 보았다. 실제적으로 전류의 크기가 감소하지 않더라도 단순히 전압 의존도만 변함으로써 같은 전압에서 기록시 전류의 크기가 감소한 것처럼 보일 수 있기 때문이다.

Fig 4A는 대조시의  $\text{Ca}^{2+}$  전류에 대한 기록이고 Fig

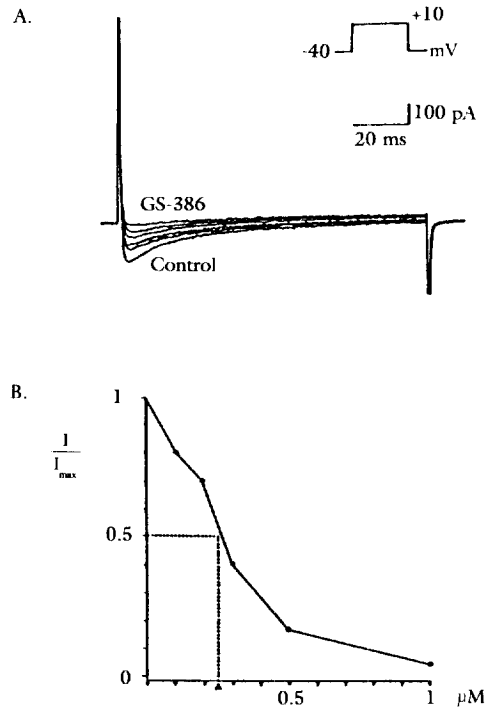


Fig 3. Relationship between the concentration of GS-386 and Ca-currents A: Ca-currents decreased according to the increase in concentrations of GS-386 to 0.15, 0.2, 0.3, 0.5, and 1  $\mu\text{M}$ . B: Dose-response curve of GS-386 and calcium current. The curve shows  $\text{ED}_{50}$  at 0.25  $\mu\text{M}$ .

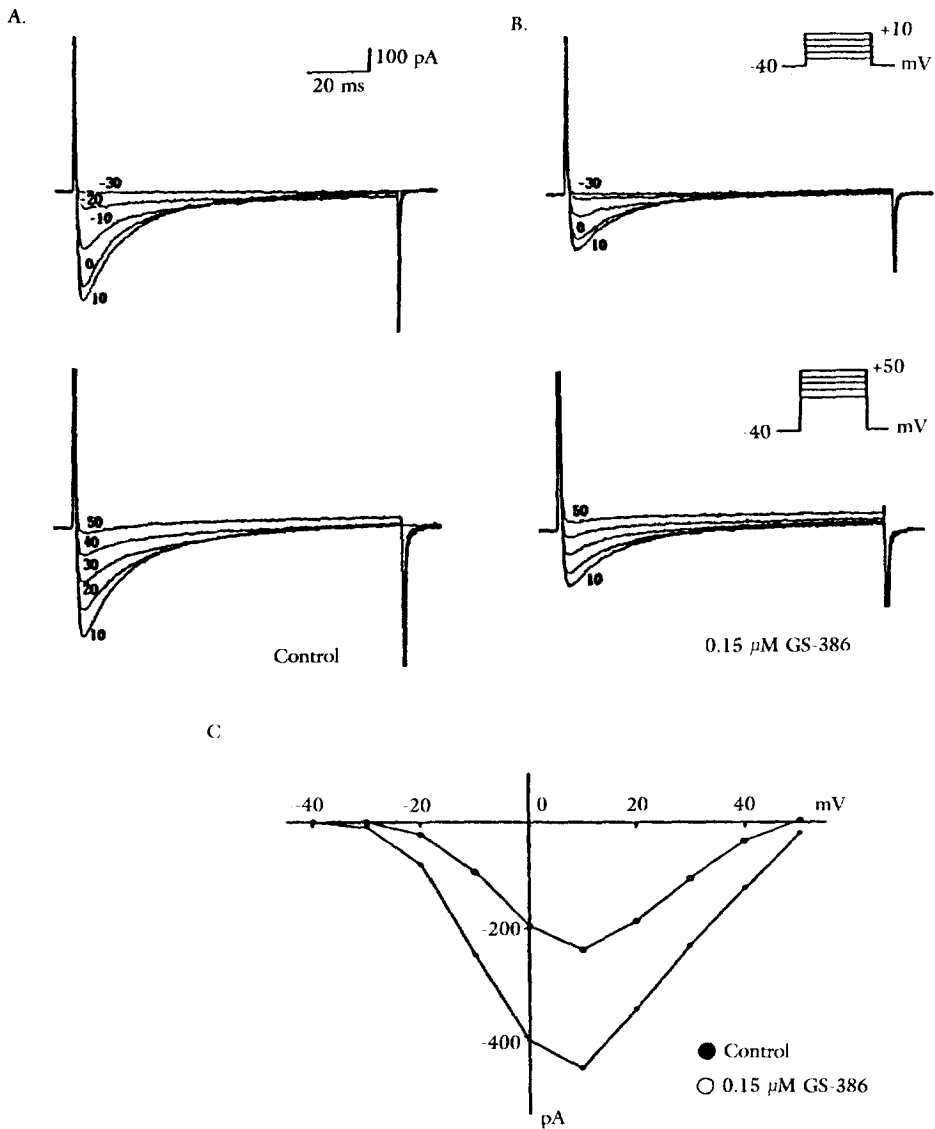


Fig 4. The effect of GS-386 on the current-voltage relationship of the Ca-current. A: Ca-currents in normal Tyrode solution. B: Ca-currents of the same cell as A after application of 0.15  $\mu\text{M}$ . C: the current-voltage relationship for the Ca-currents obtained from A and B. Ca-currents were decreased by 0.15  $\mu\text{M}$  GS-386(O) in the whole range of potential.

4B는 0.15  $\mu\text{M}$  GS-386 투여시의 기록이다. 유지전압 -40 mV에서 관찰하였으며, 30초간격으로 200 ms동안 10 mV간격으로 저분극시키며 관찰하였다. 위쪽의 그림은 -30 mV에서부터 +10 mV까지의 저분극 자극에 의한 기록이고, 아래쪽의 그림은 +10 mV에서부터 +50 mV까지의 저분극 자극에 의한 기록이다. Fig 4A와 4B로부터 모든 전압 범위에서 전류의 크기가 감소하

는 것을 관찰할 수 있었다. Fig C에서 전류-전압 곡선을 그려본 결과, GS-386 투여시에도 대조시와 같이 -30 mV에서부터  $\text{Ca}^{2+}$  전류가 활성화되며 +10 mV에서 전류 크기의 최고치를 보이는 종모양의 전압의존성을 보였다. 그러므로 GS-386에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  전류 크기의 감소는 전압의존성의 변화없이 나타남을 알 수 있었다.

$\text{Ca}^{2+}$  전류 기록시 흔히 발생하는 문제로서 시간에 따

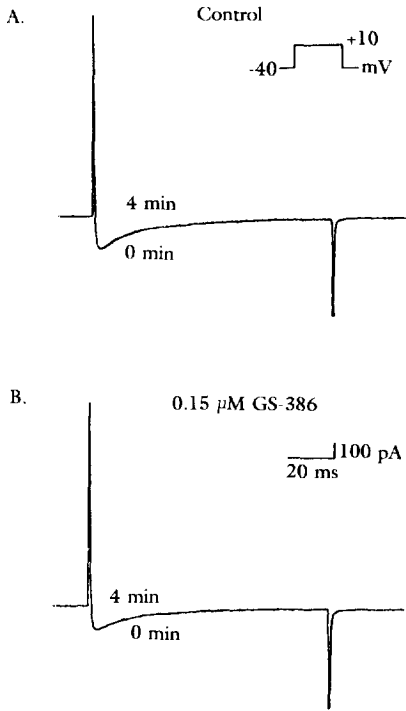


Fig 5. Examination for the occurrence of the run-down phenomenon in Ca-current. Records of Ca-currents with 4 min interval were superimposed. During 4 min the clamp pulse were given at various potentials every 30 s. In both before(A) and after(B) the application of 0.15  $\mu$ M GS-386, no run-down of the current amplitude was seen.

라 전류의 크기가 감소하는 run down 현상이 있다<sup>18</sup>. 이는 세포에 따라 그 정도가 다르며 아직까지 그 기전은 밝혀지지 않고 있다. 그러므로 GS-386에 의한  $Ca^{2+}$  전류의 감소가 run down에 의한 것인지를 감별하여야 한다. 이를 감별하기 위하여 전류-전압 관계를 관찰하기 전의 전류의 크기와 후의 크기를 비교하여 겹쳐 그려보았다(Fig 5). Fig 5A는 GS-386이 없는 대조시의  $Ca^{2+}$  전류의 크기를 비교한 것으로 유지전압 -40 mV에서 +10 mV로 200 ms 동안 저분극 시켰을 때 기록한 것으로 두 기록 사이에는 4분의 시간 간격이 있으며 이 사이에는 30초 간격으로 -30 mV에서 +50 mV까지의 저분극 자극이 주어졌다. Fig 5A에서와 같이 대조시에 기록되는  $Ca^{2+}$  전류에는 시간이 지남에 따라 전류의 크기가 감소하지 않았으므로 run down이 일어나지 않았음을 확인하였다. 모든 실험에서 GS-386을 투여하기 전  $Ca^{2+}$  전류의 run down 현상이 없는 세포에서만만

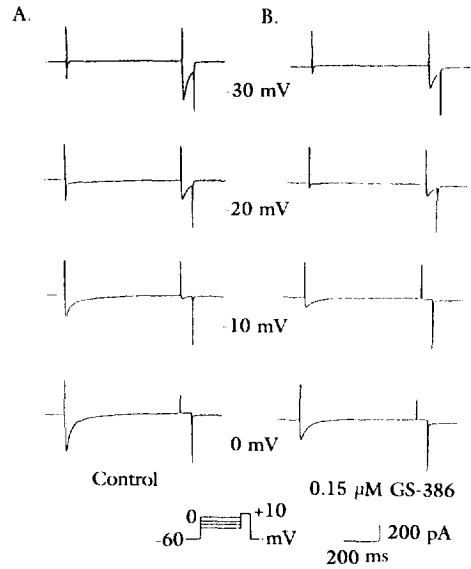


Fig 6. The effect of GS-386 on the steady-state inactivation of the Ca-current. The holding potential was -60 mV and prepulse of 500 ms was followed by a test pulse to +10 mV of 50 ms. The external solution contained 10  $\mu$ M TTX. A: in normal Tyrode solution. B: after application of 0.15  $\mu$ M GS-386.

GS-386의 효과를 관찰할 때 의의가 있는 것으로 하였다. Fig 5B는 0.15  $\mu$ M GS-386투여에 의해 전류의 크기가 감소하여 항정상상태에 이르렀을 때 Fig 5A에서와 같은 방법으로 시간의존적인 run down이 나타났는지를 관찰하였다. Fig 5B에서 볼 수 있는 바와 같이 대조시에 run-down이 없는 세포에서는 GS-386투여에 의해서도 쉽게 run down이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 그러므로 이러한 세포들에서 GS-386투여시 일어나는 전류크기의 감소는 GS-386에 의한 영향임을 확인할 수 있었다.

**GS-386이  $Ca^{2+}$  통로 항정상상태 비활성화에 미치는 영향:** 다음은 GS-386이  $Ca^{2+}$  통로에 대한 길항제(antagonist)로 작용하는 기전을 규명하기 위하여 항정상상태 비활성화(steady state inactivation) 실험을 하였다. 항정상상태 비활성화를 관찰하기 위하여는 double pulse protocol을 사용하였다. 유지전압을 -60 mV에 둔 상태에서 -60~0 mV의 전자극(prepulse)을 10 mV간격으로 500 ms의 기간동안 준 다음에 +10 mV의 시험 자극(test pulse)을 50 ms동안 주었다. 유지전압을 -60 mV로 한 이유는 -40 mV에서 이미 비활성화 상태에

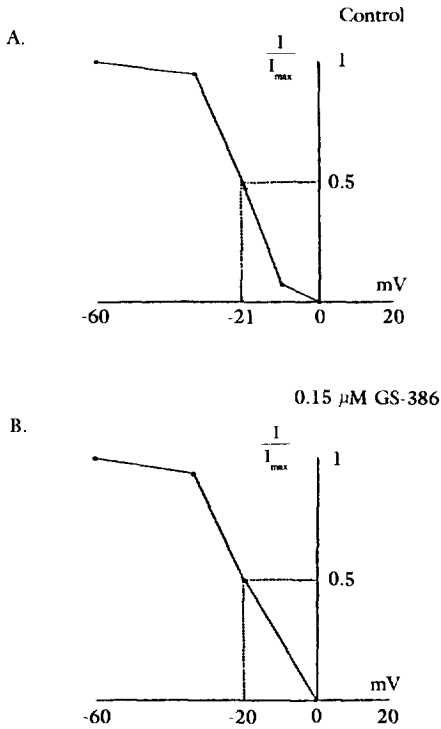


Fig 7. The effect of GS-386 on the steady-state inactivation curve of the Ca-current. The holding potential was -60 mV and prepulse of 500 ms was followed by a test pulse to +10 mV. A:  $V_h$  was -21 mV in normal Tyrode solution. B:  $V_h$  was -20 mV after application of 0.15  $\mu$ M GS-386. There was no significant shift in the steady-state inactivation curve.

있는 통로가 없도록 하기 위함이며 시험자극으로 +10 mV를 준 것은 이때  $Ca^{2+}$  전류가 최대치를 보이기 때문이다. 이때  $Na^+$  전류가 활성화되지 않도록 10  $\mu$ M TTX를 투여하였다.

Fig 6A는 대조시의 기록이며 Fig 6B는 0.15  $\mu$ M GS-386 투여시의 기록이다. 전자극을 -60~-40 mV로 주었을 때 시험자극에 의해서 가장 큰 전류가 활성화 되었으며, 전자극이 저분극될수록 저자극에 의해 활성화되는  $Ca^{2+}$  전류의 크기는 증가했지만 시험자극에 의해 활성화되는  $Ca^{2+}$  전류의 크기는 감소함을 보였다(Fig 6A, 6B). 전자극을 -60 mV로 주었을 때 시험자극에 의해서 활성화되는 전류의 크기를 기준으로 하고( $I_{max}$ ) 각각의 전자극을 주었을 때 시험자극에 의해서 활성화되는 전류( $I$ )들의 값의 비율( $I/I_{max}$ )을 구한 다음 이 비율을 전자극에 대해 표시함으로써 항정상상태 비활성화 곡선을 얻었다(Fig 7). 이때 전류의 크기가  $I_{max}$ 의 1/2이

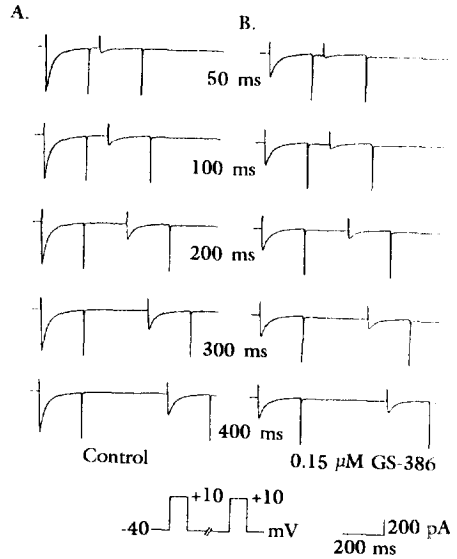


Fig 8. The effect of GS-386 on the recovery of the Ca-current. Stimulation intervals were 50, 100, 200, 300, 400 ms. The holding potential was -40 mV. A: in normal Tyrode solution. B: after application of 0.15  $\mu$ M GS-386

되는 막전압  $V_h$ 는 대조시에 -21 mV(Fig 7A), 0.15  $\mu$ M GS-386 투여시의  $V_h$ 는 -20 mV(Fig 7B)로 토끼의 단일 심방근에서의 항정상상태 비활성화곡선은 거의 이동되지 않았음을 알 수 있었다.

GS-386이  $Ca^{2+}$  전류의 회복시간에 미치는 영향: 다음에는 두개의 자극(pulse)을 그 간격을 바꾸며 두개씩 pair로 주어 두번째 자극에 의한  $Ca^{2+}$  전류의 크기를 비교함으로써 GS-386이  $Ca^{2+}$  전류의 회복시간(recovery time)에 미치는 영향을 살펴보았다. 회복시간을 구하는 실험은 유지전압 -40 mV에서 +10 mV크기의 자극을 200 ms동안 준 다음에 여러가지 시간 간격 후에 같은 크기의 자극을 200 ms동안 주는 방법을 사용하였다. Fig 8A는 대조시의 기록이고 Fig 8B는 0.15  $\mu$ M GS-386 투여시의 기록이다. 양쪽 모두에서 시간이 지남에 따라 전류가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 처음 자극에 의해서 활성화되는  $Ca^{2+}$  전류의 크기( $I_{max}$ )를 기준으로 하고 두번째 자극에 의해 활성화되는 전류( $I$ )의 비율을 구한 다음에, 이 비율( $I/I_{max}$ )을 시간에 대하여 도시하면  $Ca^{2+}$  전류가 처음에 비해서 얼마나 회복되었

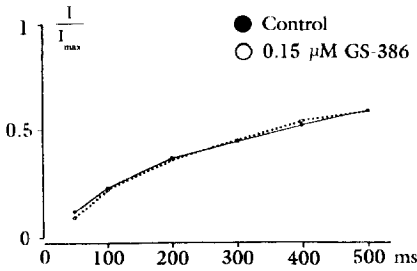


Fig 9. The effect of GS-386 on the recovery curve of the Ca-current. The holding potential was -40 mV. (●): in normal Tyrode solution. (○): after application of 0.15  $\mu$ M GS-386. There was no significant change in the recovery time constant.

는지를 알 수 있다(Fig 9). 실험을 시행한 결과 정상상태에서의 회복시간상수(recovery time constant)는 200 ms였으며 1초 내에 완전히 회복되었다. 0.15  $\mu$ M의 GS-386 투여시에도 회복시간상수는 200 ms로서 GS-386이 전류의 회복에는 아무런 영향도 미치지 않았음을 알 수 있었다.

## 고 찰

미지의 약물인 GS-386은 심근의 수축력을 감소시킨다. 심근의 수축력은 세포내에서 증가된  $Ca^{2+}$ 이 수축단백질에 작용하여 나타나는 것으로서 세포내  $Ca^{2+}$  transient를 반영한다고 볼 수 있다<sup>6</sup>. 세포내  $Ca^{2+}$  transient를 결정하는 인자로서는  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$ 의 세포내로의 유입, 세포내  $Ca^{2+}$  저장고로부터의  $Ca^{2+}$  유리, 세포내  $Ca^{2+}$  완충제의 역할, Ca-pump와 Na-Ca 교환기전에 의한 세포밖으로의  $Ca^{2+}$  유출 등을 들 수 있다. 미지의 약물 GS-386이 수축력을 감소시킨 기전을 추구하기 위해 토끼의 심방근에서 단일세포를 분리하여 막전압고정법(whole cell voltage clamp technique)<sup>8</sup>을 사용하여  $Ca^{2+}$  전류에 대한 GS-386의 효과를 관찰하였다. 본 실험에서 기록된 단일 심방근세포에서의  $Ca^{2+}$  전류의 크기, 시간 경과, 활성화 범위 등은 대체적으로 다른 연구자들의 보고와 유사하였다<sup>12,22</sup>.

지난 20년 동안 수많은  $Ca^{2+}$  통로 차단제들이 만들어졌다. 이들은 화학적 구조의 유사성과 특징적 작용양상에 의해 크게 verapamil과 같은 phenylalkylamine계, nifedipine과 같은 dihydropyridine계, 그리고 diltiazem과 같은 benzodiazepine계 등으로 나눌 수 있다.

Phenylalkylamine계와 benzodiazepine계의  $Ca^{2+}$  길항제들은 물에 쉽게 녹으며, 빛에 대해 안정성을 지니는 반면, dihydropyridine계들은 물에 녹지 않으며 대개 빛에 의해 쉽게 분해된다. 미지의 약물인 GS-386은 물에 쉽게 녹으며, 빛에 대한 안정성을 지닌 것으로 보아서는 phenylalkylamine계 또는 benzodiazepine계의 약물과 구조적으로 유사할 것으로 생각된다<sup>39</sup>.

GS-386은  $Ca^{2+}$  전류에 대하여 억제작용을 보였으며 0.25  $\mu$ M에서 전류의 크기가 최대치의 50%로 감소하였고, 1  $\mu$ M 이상에서는 전류의 대부분이 소실됨을 관찰하였다. 이는 단일 세포를 대상으로 실험한 다른 연구자들의 실험으로부터 여러 종류의  $Ca^{2+}$  길항제에 의해  $Ca^{2+}$  전류가 감소되는 것과 비교할 때 diltiazem( $ED_{50}=10 \times 10^{-6}$ )보다는 훨씬 큰 억제효과를 나타내며 nimodipine과 D-600(gallopamil) ( $ED_{50}=1 \times 10^{-7}$ )보다는 작아, GS-386은 verapamil( $ED_{50}=3 \times 10^{-7}$ )과 비슷한 역가(potency)를 지니는 것으로 생각된다<sup>3,6,20</sup>.

GS-386의  $Ca^{2+}$  전류에 대한 억제효과는 전압의존성에는 변화를 주지 않았다. 또한 항정상상태 비활성화와 전류의 회복경과에도 아무런 영향을 주지 않으면서 전류의 크기만을 감소시켰다.

단일 세포막에서 기록되는  $Ca^{2+}$  전류는 단일  $Ca^{2+}$  통로(single channel)에서 기록되는 전류들의 합으로 나타난다. 그러므로 전류의 크기는 열리는 통로의 개수와 열려있는 시간, 단일 통로에서의 전도도 등에 의해 결정된다<sup>21</sup>. 특정한 이온에 대한 단일통로의 전도도는 막전압에 따라 일정하다. GS-386은 전압의존성에 영향을 미치지 않으므로 일정한 전압에서 측정하는 단일통로의 전도도는 GS-386에 의해 영향을 받지 않을 것이다. 모든 dihydropyridine계통의 약물들은  $Ca^{2+}$  통로에 대한 효과(agonist 혹은 antagonist로서)와는 상관없이 공통적인 두가지의 작용기전을 가지고 있다. 첫째,  $Ca^{2+}$  통로의 mean open time을 증가시킨다<sup>9</sup>. 이것은  $Ca^{2+}$  전류의 항정상상태 비활성화 곡선을 과분극방향으로 이동 시키는 것으로서 나타난다<sup>121</sup>. Nifedipine과 같은  $Ca^{2+}$  통로 차단제들은 항정상상태 비활성화 곡선의 이동이 심하게 일어나기 때문에, 첫번째 기전의 효과에 비해서 두번째 기전의 효과가 커져서  $Ca^{2+}$  전류를 감소시키게 된다. GS-386은 전류의 회복경과에는 아무런 영향도 미치지 않았는데, 이로부터  $Ca^{2+}$  전류의 크기가 감소하는 것은  $Ca^{2+}$  통로의 mean open time에 변화없이 나타나는 것으로 생각된다. 항정상상태 비활성화곡선으로부터는 일정한 전압부위에서 열릴 수 있는  $Ca^{2+}$  통로에 대해 이미 비활성화되어 있는  $Ca^{2+}$  통로가 얼마나 되는지를 알 수 있는데, GS-386은 항정상상태 비활성화



곡선에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 nifedipine 등 dihydropyridine계통의 약물과는 다른 기전으로  $Ca^{2+}$  통로에 작용하는 것으로 생각할 수 있다.  $Ca^{2+}$  통로에는 두 개의 문(g와 g-gate)이 존재한다고 알려졌었는데 그 중 g-gate는 통로의 개폐가 전압의존적(voltage-dependent)인 문이며 g-gate는 전압에는 상관없이 인산화과정에 따라 통로의 개폐가 영향을 받는다(phosphorylation-dependent 및 voltage-independent)문으로서 생각되고 있다<sup>25,38</sup>. 신경전달물질(neurotransmitter)인 adrenaline 등은 후자에 영향을 미침으로써  $Ca^{2+}$ 의 유입이 가능한 통로의 숫자를 늘려서  $Ca^{2+}$  전류를 증가시키는 것으로 생각된다<sup>28</sup>. GS-386은  $Ca^{2+}$  전류에 대한 항정상태 비활성화곡선에 변화를 주지 못하였으므로, GS-386은 g-gate 보다는 g'-gate쪽에 영향을 줌으로써 열릴 수 있는  $Ca^{2+}$  통로의 수를 감소 시킬 것으로 생각된다. 그러므로 GS-386의  $Ca^{2+}$  전류에 대한 효과가 cAMP농도나 또는 phosphodiesterase등에 영향을 주는 물질들에 의해 어떠한 영향을 받는지 살펴봄으로써 인산화과정과의 관계를 좀더 추구하고 흥미로운 것 같다.

## 결 론

GS-386이  $Ca^{2+}$  전류에 미친 영향은 다음과 같다.

1. 토끼 단일 심방근 세포에서 기록된  $Ca^{2+}$  전류는 -10 mV에서부터 활성화되어 +10 mV에서 최대값을 보이고 +50 mV에서 거의 소실되었다.
2. GS-386 투여시  $Ca^{2+}$  전류의 크기가 감소하였다. 전류감소의 크기는 GS-386의 농도가 클수록 증가하였으며, 용량-반응 곡선(n=8)에서 구한  $ED_{50}$ 는  $2.5 \times 10^{-7}M$ 이었다.
3. 전류-전압 곡선상에서 GS-386투여시 전류의 크기는 감소하였으나 전압 의존성은 변하지 않았다.
4.  $Ca^{2+}$  전류의 비활성화는 GS-386 투여 전후 모두 단일 지수함수적으로 나타났으며 비활성화 시간상수는 control 상태에서 평균 35 ms, GS-386 투여시 32.5 ms로서 거의 차이가 없었다.
5. 항정상태에서의 비활성화 곡선을 구한 결과 control 상태의  $V_h$ 가 -21 mV, GS-386을 투여했을 때의  $V_h$ 가 -20 mV였다. 즉, GS-386은 토끼 심방근에서  $Ca^{2+}$  전류의 항정상태 비활성화 곡선을 거의 이동시키지 않았다.
6.  $Ca^{2+}$  전류의 회복시간을 구한 결과 control 상태에서의 회복시간상수는 200 ms정도였으며, 1초내에 완전히 회복되었다. GS-386 투여시에도 회복시간 상

수는 200 ms로서 전류의 회복에는 아무런 영향도 미치지 않았다.

이상의 결과로부터 GS-386은 전압의존성에 영향을 미치지 않으면서  $Ca^{2+}$  유입 가능한 통로의 숫자를 줄임으로써  $Ca^{2+}$  전류를 감소시키며, GS-386의  $Ca^{2+}$  전류에 대한 억제효과의 역가(potency)는 기존에 보고된 verapamil( $ED_{50}=3 \times 10^{-7}M$ )과 유사한 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Bechem M, Schramm M, Calcium-agonists. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19(Supplement II):63~75.
2. Beyer TR, Jorstrup G, Ravens U. Comparison of the cardiac effects of the dihydropyridine-derivative H160/51 with those of the "Ca-agonist" BAY K 8644. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1985; 330:142.
3. Brown AM, Kunze DL, Yatani A. Dual effects of dihydropyridines on whole cell and unitary calcium currents in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1986;379:495~514.
4. Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 1982;296:613~620.
5. 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 R Soc* 1990;B 240:61~81.
6. Ebashi S, Endo M, Calcium ion and muscle contraction. *Prog Biophys* 1968;18:123~183.
7. Erne P, Burgisser E, Buhler FR, et al. Enhancement of calcium influx in human platelets by CGP 28392, a novel dihydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:842~847.
8. Hamil 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.
9. Hess P, Lansman JB, Tsien RW. Different modes of Ca channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 1984;311: 538~544.
10. Hof RP, Ruegg UT, Hof A, et al. Stereoselectivity at the calcium channel: opposite action of the enan-

- tiomers of a 1,4-dihydropyridine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:689~693.
11. Hume JR, Giles WR. Ionic currents in single isolated bull-frog atrial cells. *J Gen Physiol* 1983;81:153~194.
  12. Isenberg G, Klockner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Archiv* 1982;395:30~41.
  13. Kaczmarek LK. The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 1987;10:39~34.
  14. Kimura JS, Miyamae, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1987;384:199~222.
  15. Kohlhardt AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1972; 117:500~544.
  16. Koidl B, Wanger B, Tritthart HA. The inhibitory effects of the novel calcium antagonist Goe 5438 on calcium-dependent processes of excitation and contraction of single cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988;337:447~453.
  17. Kokubun S, Reuter H. Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81: 482~527.
  18. Korn SJ, Horn R. Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol* 1989;94(5):789~912.
  19. Lee KS, Tsien RW. Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. *Nature* 1982;297:498~501.
  20. Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 1983; 302:790~794.
  21. Markwardt F, Nilius B. Modulation of calcium channel currents in guinea-pig single ventricular heart cells by the dihydropyridine Bay K8644. *J Physiol* 1988;399:569~575.
  22. Matsuda H, Noma A, Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent ions in dialysed ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1984;357: 553~573.
  23. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, et al. Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc R Soc* 1983;B 219:447~469.
  24. Mitchell MR et al. Calcium-activated inward current and contraction in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1987;391:545~560.
  25. Morad M, Nayler W, Kazda S, et al.(eds). *The Calcium Channel: Structure, Function and Implications* 1988;Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
  26. Noble D. *The initiation of heartbeat* 1979;Oxford. University Press, Oxford.
  27. Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984;353:1~50.
  28. Reuter H, Scholz H. The regulation of the Ca conductance of cardiac muscle by adrenaline. *J Physiol* 1977;264:49~62.
  29. Reuter H. Properties of two membrane currents in the heart. *Ann Rev Physiol* 1979;41:413~424.
  30. Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters enzymes and drugs. *Nature* 1983;301: 569~574.
  31. Reuter H. Modulation of ion channels by phosphorylation and second messengers. *News Physiol Sci* 1987;2:168~171.
  32. Sakmann B, Neher E(eds). *Single-channel recording* 1983;Plenum Press, New York London.
  33. Schramm M, Thomas G, Towart R, et al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca channels. *Nature* 1983; 303:535~537.
  34. Schramm M, Towart R. Calcium channels as drug receptors. in: Baker PF.(eds). *Calcium in drug actions* 1988;Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
  35. So IS. Transient outward current in single atrial cells of the rabbit. Thesis. 1989. Seoul Natl. Univ.
  36. Takenaka T, Maeno H. A new vasoconstrictor 1,4-dihydropyridine derivative, YC-179. *Jap J Pharmacol* 1982;32:139P.
  37. Tsien RW. Calcium channels in excitable cell mem-

branes. *Ann Rev Physiol* 1983;45:341~358.

38. Venter JC, Triggle D. *Structure and physiology of the slow inward calcium channel* 1987;Alan R. Liss, Inc., New York.

39. Winifred G, Nayler D Sc(eds) *Calcium Antagonists*. 1988;Academic Press. London. New York.

---