2種の硝酸薬のアフリカツメガエル発現L型Ca²⁺チャネルに対する薬物特異的作用

古川泰司* 渡邊英憲* 中臺 司* 神谷奈津子*
齊藤雅彦* 竹下 聡* 一色高明*

心筋L型Ca²⁺チャネルに対する作用を指標として、2種の一酸化窒素(NO)供与体と2種の硝酸薬の作用を比較検討した。アフリカツメガエル卵母細胞に心筋L型Ca²⁺チャネルを発現させ、発現したチャネルを通過するBa²⁺電流に対する各薬剤の作用を観察した。NO供与体である、S-nitroso-N-acetyl penicillamineとsodium nitroprussideはいずれも濃度依存性にBa²⁺電流を抑制し、その作用はcGMP依存性蛋白キナーゼ(PKG)依存性であった。また、ニトログリセリン(NTG)も濃度依存性にBa²⁺電流を抑制し、約100nMで最大抑制を示した(21 ± 5%, n = 11)。また同抑制はNO消去薬であるcarboxy-PITOにより消失した。一方、二硝酸イソソルビド(ISDN)は単純な濃度依存性抑制作用を示さず、電流は減少または増加した(n = 16)。しかし、carboxy-PITO存在下にISDNを作用させると同電流は常に増加し、その増加率は10 μ Mで19.4%であった(n = 6)。NTGならびにISDNはNO供与体として発現心筋L型Ca²⁺チャネルを抑制する作用を有すると考えられた。また、ISDNはこの作用に加えてNOに依存しないCa²⁺チャネル刺激作用を有すると考えられ、NTGと比較して陰性変力作用が弱いことの一因となっていることが示唆された。

(心電図, 2003; 23: 271 ~ 280)

Keywords

- カルシウムチャネル
- 一酸化窒素
- 硝酸薬
- アフリカツメガエル卵母細胞

* 帝京大学医学部内科
(〒173-8605 東京都板橋区加賀2-11-1)

I. はじめに

硝酸薬は、日常臨床において虚血性心疾患やうっ血性心不全の治療に用いられており、最終活性物質として生体内・細胞内で一酸化窒素(NO)を産生することにより、生理活性を発揮すると考えられている^{1), 2)}。一方、古くよりNO供与体も臨床使用されており、この一種であるsodium nitroprusside(SNP)

Differential effects of two nitrates on L-type Ca²⁺ channel expressed in Xenopus oocytes

Taiji Furukawa, Hidenori Watanabe, Tsukasa Nakadai, Natsuko Kamiya, Masahiko Saito, Satoshi Takeshita, Takaaki Isshiki

2002年10月11日 原稿受領 / 2003年4月4日 掲載承認

は主として体血圧の下降調節に用いられることが多い。これら硝酸薬とNO供与体との基礎薬理的/臨床薬理的差異の検討に関してはいくつかの報告があるが、この差は主として各薬物の動脈ならびに静脈に対する作用強度の差として理解されてきた。すなわち、SNPは抵抗血管としての動脈と容量血管としての静脈にほぼ均等な作用を及ぼすのに対し、硝酸薬は静脈に対する拡張作用が動脈に対する作用よりも顕著であると報告されている^{3), 4)}。さらに、同じ硝酸薬でもニトログリセリン(NTG)とこれ以外のイソソルビド化合物とでは動静脈に対する作用強度が異なるとされる^{5)~7)}。

これら薬剤の使用において、薬物動態的な理解をふまえて、各薬剤の使いわけを行うことは、一般的に行われている。NTGと比較してイソソルビド化合物の方が作用の発現・持続とも緩徐であり、虚血性心疾患においては、硝酸薬の作用時間も考慮したガイドラインも作成されている^{8)~10)}。また、慢性心不全の治療においては前負荷の減少が最も顕著であるイソソルビド化合物が用いられてきた^{11), 12)}。しかし、各薬剤の薬理学的特徴には不明な点が多く、NO供与体と硝酸薬の作用の差や、硝酸薬間での薬理作用の差の発現メカニズムは、全く明らかにされていない。

NOによる血管拡張の機序には複数のものが想定されているが、cGMP依存性タンパクキナーゼ(PKG)を介した細胞膜Ca²⁺チャネルの抑制は古くより提唱されているものである¹³⁾。そこで今回の研究では、硝酸薬の薬物特異的な作用を明らかにする目的で、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたL型Ca²⁺チャネルに対する作用を指標として、2種のNO供与体と、臨床的に用いられている2種の硝酸薬のL型Ca²⁺チャネルに対する作用を比較検討したので報告する。

II. 方 法

ウサギ心房筋由来L型Ca²⁺チャネル α_{1C} サブユニットcDNA¹⁴⁾、Ca²⁺チャネル α_2 サブユニットcDNA¹⁴⁾ならびに β_{1a} 、 β_{2a} サブユニットcDNA¹⁵⁾より、SP6

promotorを用いた*in vitro* transcription kit (MEGAscript SP6 Kit : Ambion)を用いてそれぞれのcDNAに相補的なcRNAを合成した。各RNAの濃度は、最終濃度が α_1 サブユニット0.15 μ g/ml、 α_2 サブユニット0.1 μ g/ml、 β_{1a} サブユニット0.05 μ g/ml、となるように混合・調製し、微量注入器(PP-10, Narishige, Tokyo, Japan)を用いて卵母細胞内へ注入した。注入量は総量で30~60nlとなるようにした。

cRNA注入後の卵母細胞は20℃の細胞外液中で培養し、2~4日目に電気生理学的計測を行った。培養液の組成は(mM) : NaCl 96.0, KCl 2.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, ピルビン酸 2.5, HEPES 5.0(NaOHによりpH 7.6に調製)とした。膜電流の計測にはGeneClamp 500(Axon Instruments, Foster City, CA)を用い2重微小電極法により電位固定実験を行った。特に断りのない限り、保持電位は-80mVとし、脱分極パルスは10秒ごとに加えた。灌流液の組成は以下の通りである(mM) : BaCl₂ 40, tetraethyl ammonium hydroxide(TEA-OH) 90, KOH 4, methane sulfonic acid 130, HEPES 5, niflumic acid 0.3(methane sulfonic acidによりpH 7.5に調製)。すべての計測は室温(18~22℃)で行った。測定結果はAD converter(Digidata 1200, Axon Instruments)を通じてpersonal computerの外部記憶装置にデジタルデータとして保存し、実験終了後に各種計測を行った。電流値の計測はpClamp software ver. 6.0.4(Axon Instruments)と自家製の解析ソフトウェアを用いて行った。実験結果の比較検定にはAnalysis of Variance with post hoc test(Games-Howell)を用い、危険率0.05未満を有意とした。二硝酸イソソルビドならびにニトログリセリンはエーザイ製薬(東京)より提供を受けた、その他の薬物はSigma(U.S.A.)より購入した。ニトログリセリン以外の薬物は、使用前にdimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解し、100mM溶液とした後に、最終濃度となるように細胞外液中に溶解した。ニトログリセリンは0.5mg/mlのマニトール溶解液(21.9mM溶液)を、直接細胞外液中に添加した。電流計測におけるDMSOの最高濃度は

0.1%, マンニトールの最高濃度は0.05%以下で、我々の実験条件において、同濃度のDMSO (n = 5) ならびにマンニトール (n = 4) による発現イオンチャネルの変化はまったく認められなかった¹⁶⁾。

Ⅲ. 結 果

図1に卵母細胞に発現させたL型 Ca^{2+} チャネル ($\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{2a}$) に対するNO供与体、S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) の作用を示す。この卵母細胞において、先に報告されているとおり、心筋・平滑筋で観察されるものと同様の、L型 Ca^{2+} チャネルの電気生理学的・薬理的性質を有するチャネル発現がみられている¹⁶⁾。図1Aは保持電位 -80mV より $+10\text{mV}$ に脱分極させた際の、 Ba^{2+} 電流の重ね合わせ記録である。最大内向き電流値ははじめ $0.92 \mu\text{A}$ であったが、SNAP $10 \mu\text{M}$ を作用させると次第に減少し、約5分後には $0.64 \mu\text{A}$ となった。図1Bはこの

時間経過を示したものである。図1Cに示されるごとく、SNAP作用後膜電流の閾値、最大内向き電流を与える膜電位などチャネル活性化の電位依存性には明らかな変化は認められていない。同様の実験を各種SNAPの濃度で複数例について行い、図2に示す濃度作用関係を求めた。また、 Ca^{2+} チャネル β サブユニットに骨格筋由来の β_{1a} を用いた Ca^{2+} チャネル ($\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{1a}$) についても行ったが、SNAP $10 \mu\text{M}$ における抑制率は $\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{2a}$ について $26.3 \pm 4.6\%$ (n = 10), $\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{1a}$ については $28.2 \pm 2.6\%$ (n = 5) で、両者の間に有意の差は認めなかった。そこで、以後本研究では、 $\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{2a}$ チャネルについて検討を行った。

図1と同様の実験を別のNO供与体であるsodium nitroprusside (SNP) についても行い、SNAPの作用とともにまとめたのが図2である。SNAP, SNPとも Ba^{2+} 電流を用量依存性に抑制し、その抑制効果は

図1 Ba^{2+} 電流に対する、S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) の作用

A：培養3日目の卵母細胞における、 Ba^{2+} 電流の実電流記録を示す。細胞外より作用させたSNAPにより膜電流の減少が見られ、同作用は薬物洗い流しによりほぼ消失した。B：最大内向き電流値の時間経過。C：同実験における電流電圧関係。SNAPは、閾値、最大内向き電流値を与える膜電位など、 Ba^{2+} 電流活性化の膜電位依存性には明らかな影響を与えていないことがわかる。

図2 Ba²⁺電流に対する2種のNO供与体作用のまとめ

S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) 並びに, sodium nitroprusside (SNP), を種々の濃度で作用させ, Ba²⁺電流抑制の濃度作用関係を作成した。

1 μM から 10 μM 程度ではほぼ飽和状態となったが, 最大抑制率は, SNAPの方がSNPより大きかった。

アフリカツメガエル卵母細胞においてcGMP依存性蛋白キナーゼ(PKG)の活性化は発現L型Ca²⁺チャネルに対して抑制的に作用することが示されている¹⁷⁾。今回の我々の実験におけるNO供与体は同様の経路を用いてPKG依存性に抑制が行われていることを確認するため, 卵母細胞にあらかじめNO消去剤であるcarboxy-PTIO (1 μM), 可溶性guanylate cyclase阻害薬であるmethylene blue (10 μM), またはPKGの特異的阻害薬とされるKT-5823 (100nM)を作用させ, この後にSNAPまたはSNP (いずれも 10 μM)を作用させた。図3にこの結果を示す。上記前処置薬は, ここで用いた濃度では, 前処置薬単独ではBa²⁺電流に何ら影響を与えなかった。SNAPの場合, 上述3種のいずれの薬物も抑制作用を有意に減弱させた。SNPの場合は, いずれの薬物による前処置も抑

図3 NO供与体作用の各種薬物による変化

NO消去剤であるcarboxy-PTIO (1 μM), 可溶性guanylate cyclase阻害薬であるmethylene blue (10 μM), またはPKGの特異的阻害薬とされるKT-5823 (100nM)をあらかじめ作用させ, 2種のNO供与体単独のBa²⁺電流に対する作用と比較した。各薬物とも, NO供与体作用に拮抗することがわかる。

制作用に拮抗したが, carboxy-PTIO以外は有意差を得るに至らなかった。

次に, 上述の結果をふまえ, 臨床使用されている2種の硝酸薬について検討を行った。図4に卵母細胞に発現させたL型Ca²⁺チャネル(α_{1C}α₂β_{2a})に対するニトログリセリン(NTG)の作用を示す。図1での実験と同様に, 保持電位-80mVより+10mVへの脱分極パルスを加えた際の膜電流記録を示す。対照時の記録の後, 灌流液中にNTGを添加し, 膜電流の記録を継続した。卵母細胞はNTG 0.1 μM中に5分間おかれ, さらにNTG 1.0 μM中に5分間おかれた。図Aは対照時と各濃度のNTG作用5分目の膜電流重ね合わせ記録である。NTGはこのBa²⁺電流を減少させていることがわかる。また図Bは, 同実験における最大内向き電流値の時間経過を示している。NTGの作用は, 投与開始後約3分で, ほぼ定常状態に達し, 同実験ではその抑制率は0.1 μMで

図4 Ba²⁺電流に対する、ニトログリセリン (NTG) の作用

A : Ba²⁺電流の実電流記録を示す。細胞外より作用させた、NTGにより濃度依存性に膜電流の減少が見られる。B : 最大内向き電流値の時間経過。C : 同実験における電流電圧関係。NTGは、閾値、最大内向き電流値を与える膜電位など、Ba²⁺電流活性化の膜電位依存性には明らかな影響を与えていないことがわかる。

15.1%, 1.0 μMで21.3%であった。Ba²⁺電流は作用させたNTGの濃度に依存して、減少していることがわかる。図Cに示されるごとく、NTG作用後膜電流の閾値、最大内向き電流を与える膜電位などチャネル活性化の電位依存性には明らかな変化は認められていない。同様の実験を各種NTGの濃度で複数例について行い、図7の集計に用いた。

図5には、Ba²⁺電流に対する二硝酸イソソルビド (ISDN) の作用を示す。図4での実験と同じく、膜電流記録下に灌流液中にISDNを添加している。この実験では、図4での実験とは様相を異にし、0.1 μM ISDN中では、Ba²⁺電流は抑制されず、5分間作用時の電流値は対照時の107%と、むしろわずかに増加している。さらに、ISDN濃度を、10 μMに増加すると、膜電流値は対照時の87.2%に減少した。同様の実験を、複数例の卵母細胞について行ったが、実験ごとの結果のばらつきは大きく、0.1 μM ISDN中

で必ずしも膜電流が常に増加を示すとは限らなかった (図7参照)。

次に、硝酸薬の作用が、NOによってもたらされているか否かを検討するために、卵母細胞に、NO消去剤であるcarboxy-PTIO (1.0 μM) をあらかじめ作用させておき、この後にNTGかISDNのいずれかを作用させた。図6は、carboxy-PTIO前処置卵母細胞における1.0 μMならびに10 μMのISDNの作用をみたものである。前述NO供与体の実験の項でも述べたが、carboxy-PTIO (1.0 μM) 単独作用時には、Ba²⁺電流は明らかな変化をきたしていない。このうち、ISDNを作用させるとBa²⁺電流はISDNの濃度に依存して増加した。各濃度のISDN作用は、約5分間で定常状態に達しており、同実験ではBa²⁺電流は、1.0 μMのISDNにより対照時の109%に、10 μMのISDNにより対照時の119%にそれぞれ増加している。

図5 二硝酸イソソルビド (ISDN) の作用

A : Ba^{2+} 電流の実電流記録. B : 最大内向き電流値の時間経過. 細胞外より作用させた ISDN では, NTG とは異なり濃度依存性の膜電流抑制を示さない. C : 同実験における電流電圧関係. ISDN は, Ba^{2+} 電流活性化の膜電位依存性には明らかな影響を与えていないことがわかる.

図6 Carboxy-PTIO 作用下の, 二硝酸イソソルビド (ISDN) の作用

A : Ba^{2+} 電流の実電流記録. Control 状態では carboxy-PTIO のみを作用させている. B : 最大内向き電流値の時間経過. Carboxy-PTIO 作用下では, 細胞外より作用させた ISDN は, 濃度依存性に膜電流を増加させた. C : 同実験における電流電圧関係.

図7 ニトログリセリン (NTG)、二硝酸イソソルビド (ISDN) 単独ならびに carboxy-PTIO 作用下の濃度作用関係

白抜きの記号は単独作用時の、黒塗りの記号はあらかじめ carboxy-PTIO を作用させたときの作用を示す。

同様の実験を NTG は 0.1, 1.0 μM , ISDN は 1.0, 10 μM の濃度について、複数例について行い、両硝酸薬単独での濃度作用関係とともに、図7にまとめた。NTG は単独では、ほぼ濃度依存性に Ba^{2+} 電流抑制作用を示し、およそ 1.0 μM で最大抑制率 (約 25%) を示した。Carboxy-PTIO は、NTG 単独での Ba^{2+} 電流抑制作用に拮抗し、同薬物前処置下では 0.1 μM , 1.0 μM の NTG は Ba^{2+} 電流に対して有意な抑制作用を示さなかった。一方、先に述べたように ISDN の Ba^{2+} 電流に対する作用は、実験ごとの結果のばらつきが大きく、一定数の実験を行った後も、標準誤差は $\pm 10\%$ 程度の値を示している。1.0 μM 程度の ISDN を作用させた実験では、図5にあるようにわずかに膜電流を増加させた例もあったが、全体としては ISDN はわずかに Ba^{2+} 電流を抑制している。同 ISDN 単独の膜電流に対する作用は 10 μM 前後で最大抑制率 (約 10%) を示し、さらに濃度を上げると抑制率が減少する傾向をみせた。Carboxy-PTIO 前処置下の卵母細胞における実験では、ISDN は抑制作用を全く示さず、1.0 μM , 10 μM の作用を比較した限りでは、濃度依存性に Ba^{2+} 電流を増加さ

せることがわかった。

IV. 考 察

今回の研究で我々は、2種の NO 供与体と、2種の硝酸薬が、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた L 型 Ca^{2+} チャネルに対し抑制的に作用し、硝酸薬の作用発現には NO の存在・放出が必要であることを明らかにした。さらに、2種の硝酸薬の間で L 型 Ca^{2+} チャネルに対する薬理学的作用に差が認められることを示した。

L 型 Ca^{2+} チャネルの、NO を含む細胞内情報伝達系による調節機構は、未だ完全に解明されているとはいえないが、後述のようにアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた同チャネルでは、各種外来性刺激に対して PKA を介した調節が行われない点、NO や PKG の作用を単離してみるには好都合な実験系であると考えられる。卵母細胞内では PKA 活性は外来刺激がなくても高いことが示され¹⁸⁾、現在卵母細胞において L 型 Ca^{2+} チャネルの PKA による調節が起こらないのは、基底状態で飽和状態にまでチャネルはすでにリン酸化されているためか¹⁸⁾、PKA から

チャンネルリン酸化に至る過程で何らかの補助的因子が欠損しているため、と考えられている¹⁹⁾。今回の報告では、アフリカツメガエル卵母細胞に発現せしめた、L型Ca²⁺チャンネル($\alpha_{1C} \alpha_2 \beta_{1a}$)に対し、S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP)ならびに、sodium nitroprusside (SNP)が、1 μ M以下の濃度から抑制作用を示し、この抑制はcarboxy-PITO, methylene blue, KT-5823の各薬物で拮抗された。SNPの作用に対する拮抗作用は、後者2つの薬物では統計的有位差をもたらすにはいたらなかったが、これはSNP単独での抑制作用がSNAPに比して小さいためであると考えられ、いずれのNO供与体による作用も、細胞内guanylate cyclaseの活性化によるcGMPの生成が関与していると考ええる。本研究で用いられた硝酸薬の作用濃度もこれらNO供与体の作用濃度と極めて近く、carboxy-PITOの作用を考えあわせると、卵母細胞において硝酸薬はNO供与体として機能していることを示す所見と考える。

Jiangら¹⁷⁾は本研究と同じくアフリカツメガエル卵母細胞に心筋由来の α_{1C} サブユニットを単独ならびに $\alpha_2 \beta_{2a}$ サブユニットと共発現させることにより、細胞透過性のcyclic GMP (8-bromo cGMP)が α_{1C} サブユニットのPKGによる直接のリン酸化によってチャンネル活性を変化させると報告している。この報告で用いられた、各種チャンネルクロンは、本研究のものと同じである。また、本研究の結果に示したごとく β_{2a} と β_{1a} の交換によるSNAPの作用には差が認められず、NO供与体、硝酸薬両者の作用とも、Ca²⁺チャンネル β サブユニットサブタイプに関わらず、共通の標的蛋白として α_1 サブユニットに作用してチャンネル活性を調節していると考えられる。したがって、今回の実験で用いた4種の薬物も最終的にはPKGによる直接のリン酸化によってチャンネル活性を変化させている可能性が高いと考えられる。

はじめに述べたごとく、硝酸薬とNO供与体はともに臨床に供されているが、経験的にその使いわけが行われてきた。各薬剤の*in vivo*作用が異なることは、その動静脈に対する作用強度が異なるためと理

解されてきた。実際、ウサギ腎動静脈ならびにラット動静脈においてイソソルビド化合物の静脈選択性が報告されている³⁾。しかし、NOを共通の作用物質としながら、各薬剤の動静脈間での作用強度の差がいかなる機序で発現するかは、不明なままであった。

今回の報告で、各種硝酸薬はその薬物動態に差があるのみならず、L型Ca²⁺チャンネルに対する薬理作用としても異なった作用をもつことが明らかとなった。実験条件は非生理的であるが、硝酸薬の作用が共通作用物質としてのNO単独の作用だけではなく、薬剤固有の作用を有することを示した点は、血管選択性の理解のうえからも意義ある所見と考えられる。NOの血管拡張作用に関しては複数の機序の存在が示されているが、NOに対するK⁺チャンネルの感受性や^{20), 21)}、NO血管拡張におけるprotein kinase C感受性成分²²⁾等には血管部位による差が報告されている。今回我々の報告した、ISDNによるNO非依存性のL型Ca²⁺チャンネル刺激作用の各組織における感受性は今のところ不明であるが、その分布がNOの作用と異なれば、硝酸薬の血管選択性を薬理学的に説明できることになる。

また、NOの血管拡張作用発現の機序として、PKG依存性のL型Ca²⁺チャンネルリン酸化に引き続くチャンネル活性の抑制と細胞内Ca²⁺の減少というメカニズムは古くから想定されてきたものである²³⁾。この作用機序そのものに動静脈間で差があるかどうかは、現在不明であるが、今回の我々の結果は、ISDNはこのメカニズムに拮抗する作用を内在することを示している。単純に考えると、L型Ca²⁺チャンネルを多く発現する血管平滑筋は、抵抗血管である動脈により多く存在しており、ISDNの血管拡張作用が動脈より静脈において顕著であることとよく符合する。ISDNの臨床使用濃度は静脈内投与時最大で1 μ M程度と考えられ^{24), 25)}、今回の結果からは臨床使用濃度でもCa²⁺チャンネル活性増強が起こりうることを示唆する。しかし、ウサギ腎動脈を用いた検討では、10 μ Mまで血管拡張作用に減弱はみられておらず³⁾、ISDNが今回我々が用いた卵母細胞以外の

細胞環境や, *in vivo* 環境で実際にL型Ca²⁺チャネルに対して同様の増強作用を有し, 血管拡張に対して拮抗メカニズムが作用しているか否かは今後の検討を待つ必要がある。

ISDNのBa²⁺電流増強作用が, いかにしてもたらされるかは現時点では不明である。この作用は, ISDNのNO発生による作用を, NO scavengerであるcarboxy-PTIOでマスクすることにより初めて認められた作用であり, 少なくとも, NO生成の後に引き起こされた反応とは考えにくい。また, はじめに述べたように卵母細胞発現系では, I_{Ca}の増強をもたらす反応として最も一般的なPKAによるチャネルのリン酸化は認められず^{19), 26)}, この系の関与も考えにくい。Ca²⁺チャネル・アゴニストとして知られるBayK-8644のように, 薬剤そのものにチャネル活性を増強する作用があるのかもしれないが²⁷⁾, 各種代謝産物や, PKA, PKG以外の反応系の関与も考慮する必要があるものと思われる。

〔文 献〕

- 1) Ignarro LJ : Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*, 1989 ; 65 : 1 ~ 21
- 2) Kawamoto JH, McLaughlin BE, Brien JF, Marks GS, Nakatsu K : Biotransformation of glyceryl trinitrate and elevation of cyclic GMP precede glyceryl trinitrate-induced vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990 ; 15 : 714 ~ 719
- 3) Kreye VA, Stiefel A : *In vivo* and in vitro studies to elucidate the hemodynamic differences of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and two isosorbide nitrates. *Z Kardiol*, 1983 ; 72 : 52 ~ 55
- 4) Stiefel A, Kreye VA : On the haemodynamic differences between sodium nitroprusside, nitroglycerin, and isosorbide nitrates. Comparison of their vasorelaxant effects in vitro and of their inactivation *in vivo*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1984 ; 325 : 270 ~ 274
- 5) Muikku O, Hynynen M, Salmenpera M, Harjula A, Heinonen J : Pulmonary vascular effects of trinitroglycerin and isosorbide dinitrate after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth*, 1993 ; 71 : 720 ~ 724
- 6) Muikku O, Hynynen M, Salmenpera M, Heinonen J : Vasodilator properties of nitroglycerin and isosorbide dinitrate during cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth*, 1992 ; 68 : 376 ~ 380
- 7) Toyoda J, Hisayama T, Takayanagi I : Effects of nitro compounds, isosorbide dinitrate, 5-isosorbide mononitrate and glyceryl trinitrate on Ca-uptake into Ca-stores and Ca-release from Ca-stores in rabbit isolated femoral veins and femoral arteries. *Gen Pharmacol*, 1987 ; 18 : 95 ~ 97
- 8) Jugdutt BI, Warnica JW : Intravenous nitroglycerin therapy to limit myocardial infarct size, expansion, and complications. Effect of timing, dosage, and infarct location [published erratum appears in *Circulation* 1989 May ; 79(5) : 1151]. *Circulation*, 1988 ; 78 : 906 ~ 919
- 9) Durrer JD, Lie KI, van Capelle FJ, Durrer D : Effect of sodium nitroprusside on mortality in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1982 ; 306 : 1121 ~ 1128
- 10) Gunnar RM, Bourdillon PD, Dixon DW, Fuster V, Karp RB, Kennedy JW, Klocke FJ, Passamani ER, Pitt B, Rapaport E, et al. : ACC/AHA guidelines for the early management of patients with acute myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (subcommittee to develop guidelines for the early management of patients with acute myocardial infarction). *Circulation*, 1990 ; 82 : 664 ~ 707
- 11) Cohn JN, Archibald DG, Ziesche S, Franciosa JA, Harston WE, Tristani FE, Dunkman WB, Jacobs W, Francis GS, Flohr KH, et al. : Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med*, 1986 ; 314 : 1547 ~ 1552
- 12) Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M, et al. : A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure [see comments]. *N Engl J Med*, 1991 ; 325 : 303 ~ 310
- 13) Mery P-F, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R : Nitric oxide regulated cardiac Ca²⁺ current. *J Biological Chemistry*, 1993 ; 268 : 26286 ~ 26295
- 14) Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S : Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, 1989 ; 340 : 230 ~ 233

- 15) Mori Y, Friedrich T, Kim M-S, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, Mikoshiba K, Imoto K, Tanabe T, Numa S : Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature*, 1991 ; 350 : 398 ~ 402
- 16) Furukawa T, Yamakawa T, Midera T, Sagawa T, Mori Y, Nukada T : Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking Ca^{2+} channel subtypes expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999 ; 291 : 464 ~ 473
- 17) Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V, Wray D : Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2000 ; 275 : 6135 ~ 6143
- 18) Singer-Lahat D, Lotan I, Biel M, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N : Cardiac calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes are modulated by dephosphorylation but not by cAMP-dependent phosphorylation. *Receptors Channels*, 1994 ; 2 : 215 ~ 226
- 19) Perets T, Blumenstein Y, Shistik E, Lotan I, Dascal N : A potential site of functional modulation by protein kinase A in the cardiac Ca^{2+} channel $\alpha 1C$ subunit. *FEBS Lett*, 1996 ; 384 : 189 ~ 192
- 20) Chen XL, Rembold CM : Cyclic nucleotide-dependent regulation of Mn^{2+} influx, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and arterial smooth muscle relaxation. *Am J Physiol*, 1992 ; 263 : C468 ~ C473
- 21) Hamaguchi M, Ishibashi T, Imai S : Involvement of charybdotoxin-sensitive K^+ channel in the relaxation of bovine tracheal smooth muscle by glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992 ; 262 : 263 ~ 270
- 22) Perez-Vizcaino F, Villamor E, Duarte J, Tamargo J : Involvement of protein kinase C in reduced relaxant responses to the NO/cyclic GMP pathway in piglet pulmonary arteries contracted by the thromboxane A_2 -mimetic U46619. *Br J Pharmacol*, 1997 ; 121 : 1323 ~ 1333
- 23) Mery P-F, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R : Ca^{2+} current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991 ; 88 : 1197 ~ 1201
- 24) Morrison RA, Wiegand UW, Jahnchen E, Hohmann D, Bechtold H, Meinertz T, Fung HL : Isosorbide dinitrate kinetics and dynamics after intravenous, sublingual, and percutaneous dosing in angina. *Clin Pharmacol Ther*, 1983 ; 33 : 747 ~ 756
- 25) Santoni Y, Iliadis A, Cano JP, Luccioni R, Frances Y : Pharmacokinetics of isosorbide dinitrate and its mononitrate metabolites after intravenous infusion. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1986 ; 14 : 1 ~ 17
- 26) Blumenstein Y, Ivanina T, Shistik E, Bossi E, Peres A, Dascal N : Regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channel by coexpression of $\text{G}(\alpha_s)$ in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett*, 1999 ; 444 : 78 ~ 84
- 27) Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC : Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol*, 1986 ; 18 : 691 ~ 710