개 폐동맥 평활근세포의 Capacitative Calcium Entry에 Nicardipine이 미치는 영향

한양대학교 의과대학 마취통증의학과

염종훈 · 신혜인 · 심재항 · 전우재 · 조상윤 · 신우종 · 김경현

= Abstract =

The Effect of Nicardipine on Capacitative Calcium Entry in Canine Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells

Jong Hun Yeom, M.D., Hye In Shin, M.D., Jae Hang Shim, M.D., Woo Jae Jeon, M.D.,
Sang Yoon Cho, M.D., Woo Jong Shin, M.D., and Kyoung Hun Kim, M.D.

Department of Anesthesia and Pain Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background: Capacitative calcium entry involves the influx of Ca^{2+} across the sarcolemma in response to the depletion of intracellular Ca^{2+} stores. Presently, little is known about the nature of the intracellular Ca^{2+} store (s) in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs), even though the unique contractile response of this tissue to hypoxia may at least partially involve the intracellular release of Ca^{2+} . The authors aimed to investigate the effects of nicardipine on capacitative calcium entry.

Methods: Isolated pulmonary smooth muscle cells were obtained from enzymatically treated canine pulmonary artery. Currents were recorded at room temperature using the dialyzed whole cell recording technique. The protocol used to deplete intracellular Ca^{2+} stores and to monitor the development of the store-operated Ca^{2+} currents, involved cells being voltage-clamped at 0 mV to inactivate any voltage-dependent calcium currents, which were recorded in response to a 200 ms voltage step from 120 to 40 mV in 20 mV increments.

Results: Simultaneous depletion of intracellular Ca^{2+} leads to linear store-operated Ca^{2+} current (I_{SOC}) reversal near 0 mV. Nicardipine does not affect I_{SOC} .

Conclusions: In canine PASMCs, the depletion of intracellular Ca^{2+} stores leads to the activation of I_{SOC} , which is not inhibited by nicardipine, a voltage-dependent Ca^{2+} channel (VDCC) blocker, indicating that VDCC blocked by nicardipine does not contribute to CCE in canine PASMCs. (**Korean J Anesthesiol 2003; 44: 555~561**)

Key Words: Canine pulmonary artery smooth cells; capacitative calcium entry; dialyzed whole cell; store-operated calcium currents; nicardipine.

서 론

논문접수일 : 2003년 11월 11일

책임저자 : 염종훈, 경기도 구리시 교문동 249-1
한양대학교 의과대학 마취통증의학과
우편번호: 471-701
Tel: 031-560-2390, Fax: 031-563-1731
E-mail: yeomjh@hanyang.ac.kr

저산소폐혈관수축(Hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV)은 폐혈관류가 가스 교환이 최적화되도록 환기와 어울리게 하는 필수적인 기전이다. 그러나 과도한 폐혈관수축과 순환하는 혈관활성 작용제의 증

가는 폐혈관고혈압을 초래할 수 있다.¹⁻⁴⁾ 저 산소증에 대한 폐동맥의 독특한 수축반응에는 근육세포질세망 저장소(sarcoplasmic reticulum store, SR stores)로부터 Ca^{2+} 의 유리와 수용능력 칼슘입장[capacitative calcium entry, CCE]경로의 활성화가 최소한 부분적으로 관계되어 있다.⁵⁾ 신경전달물질이나 순환하는 호르몬에 의한 G-protein-coupled receptors의 활성화는 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 유리와 전압의존성 칼슘통로(voltage-dependent Ca^{2+} channels, VDCC)을 통한 calcium 입장을 포함한 경로를 통하여 폐혈관수축을 일으킨다.⁶⁾ 이 중에서 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 고갈은 CCE라고 불리우는 과정을 통하여 원형질막을 통하여 Ca^{2+} 입장을 야기시킨다.⁷⁻¹⁰⁾ 이것은 store-operated Ca^{2+} channels (SOC)을 통하여 일어나며 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 충전은 SOC를 닫는다고 한다. 그러나 CCE 활성화와 근간이 되는 전도의 기전은 잘 이해되지 않고 있다.

세포 내 Ca^{2+} 저장소의 고갈로 인하여 CCE가 활성화되어 Ca^{2+} 유입이 될 때 nifedipine에 의해 차단되는 VDCCs가 관여하는 지 알아보기 위하여 calcium 길항제인 nifedipine을 이용하여 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

세포 분리

본 대학의 동물실험위원회의 승인을 얻은 후 암수 잡종견을 pentobarbital sodium (45 mg/kg i.v)와 ketamine (15 mg/kg i.v)으로 안락사 시킨 후 폐를 그 즉시 절개하였다. 주폐동맥은 저- Ca^{2+} 생리식염수(physiologic saline solution, PSS)로 관류하였으며 성분은 다음과 같다: 125 NaCl, 5.36 KCl, 0.336 Na_2HPO_4 , 0.44 K_2HPO_4 , 11 HEPES, 1.2 MgCl_2 , 0.05 CaCl_2 , 10 glucose, 2.9 sucrose (mM): Tris로 pH 7.4, sucrose로 osmolarity는 300 mosmol로 조절. 저- Ca^{2+} PSS는 해부하는 동안 100% 산소로 포화 하였고 혈관내피세포는 제거하지 않았다. 세포의 대사를 감소시키기 위하여 5°C에서 폐동맥의 3번째와 4번째 분지의 결합조직을 제거한 후 2-3 mm의 크기로 절제하여 신선한 저- Ca^{2+} PSS이 들어 있는 유리관에 보관하였다. 조직은 바로 소화시키거나 5°C 냉장고에 보관하였다. 세포들을 분산시키기 위해 0.5 collagenase type XI, 0.03 elastase type IV와 0.5 bovine serum albumin

(fat-free, mg/ml) 을 포함한 저- Ca^{2+} PSS로 5°C에서 14-15시간 동안 배양하였다. 배양 후 효소가 없는 저- Ca^{2+} PSS로 5-6회 씻어내고 불꽃 처리된 Pasteur 피펫으로 잘게 부수었다. 이렇게 만들어진 폐동맥평활근세포는 실험이 시행될 때 까지 최대 8시간까지 5°C로 보관되었다.

전기 생리

혈관내피세포는 원형 혹은 타원형인데 반해 폐혈관 평활근세포는 가늘고 긴 모양이어서 모양으로 쉽게 구분이 되며 선택된 폐혈관 평활근세포의 전압고정전류[Voltage clamp currents]는 patch clamp 기술의 회석 전세포 형상[dialyzed whole cell configuration]으로 기록하였다. 실험은 실온(18-20°C)에서 시행하였으며 고 저항밀봉은 불꽃처리된 borosilicate 피펫(1.4 Mohm)을 사용하여 얻었고 피펫 용액(mM)은 140 Cs-aspartate, 0.5 3,4-diaminopyridine, 12 BAPTA, 0.9 CaCl_2 , 3.2 MgCl_2 와 10 HEPES로 만들었으며 CsOH로 pH 7.2, mannitol로 285-300 mOsm를 유지하였다. 기준적인 patch clamp amplifier (EPC-7, List Medical Inc, USA)를 이용하여 전 세포전류[whole cell currents]를 기록하였다. SOC의 활성화는 voltage-gated Ca^{2+} 과 Na^+ currents를 최소화하기 위하여 최소 5분간은 전압 0 mV로 유지한 후에 120 mV로부터 60 mV까지 15초 간격으로 매 20 mV 증가간격으로 200 ms Voltage steps을 적용하였다. 폐평활근세포는 초기에 2 mM의 calcium을 포함한 표준 Tyrode 용액[138 NaOH, 2 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0.5 3,4-diaminopyridine, 10 HEPES and 10 D-glucose (mM): methanesulfonic acid로 pH 7.4, mannitol로 285-300 mOsm로 조절]에 보관하였으며 전세포형상을 얻고 욕조용액에서 2분간 안정화 시킨 후 Ca^{2+} -free Tyrode 용액[140 NaOH, 0.5 3,4-diaminopyridine, 10 HEPES and 10 D-glucose (mM): methanesulfonic acid로 pH 7.4, mannitol로 285-300 mOsm로 조절]으로 바꾸었다. 용액교체 후 currents가 안정된 다음 sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases 억제제로 dimethyl sulfoxide [DMSO]에 용해된 10 μM cyclopiazonic acid [CPA]와 caffeine-sensitive SR의 Ca^{2+} 고갈을 야기시키는 10 μM ryanodine를 투여하였으며 또한 세포 내 calcium 저장소가 완전히 고갈되도록 10 μM 5-hydroxytryptamine [5-HT]과 10 mM caffeine을 주입하였고 저장소가 완전히 고갈

된 후 nicardipine을 투여하였다(Fig. 1). CPA는 DMSO로 용해하여 10 mM의 저장 용액으로 만들었고 ryanodine은 Ca^{2+} -free Tyrode 용액으로 10 mM의 저장 용액으로 만들어서 육조용액에서 1 : 1,000으로 희석되어 최종농도가 10 μM 이 되도록 하였다. 5-HT와 caffeine은 실험당일에 만들어서 사용하였다. 각 용액 교체와 nicardipine을 투여 후 위에서 언급한 voltage step을 실행하였으며 자료는 1 KHz Bessel filter를 통하여 5 KHz로 얻었다. 실험 중 고 저항밀봉이 1 Gohm 이하로 된 경우에는 실험을 중단하였다. 접합전위(junctional potential)는 기계적으로 상쇄하였으며 얻어진 자료의 누출전류(leak currents)는 수동적으로 교정하였고 계열저항(series resistance)은 교정

Fig. 1. The protocol used to deplete intracellular Ca^{2+} stores.

하지 않았다. 얻어진 자료는 pClamp software (version 8.01, Axon Instrument, USA)을 사용하여 분석하였고 GraphPad Prism (version 3.0, GraphPad Software, USA)을 이용하여 통계 처리하였다. 자료는 평균 $\pm$ 평균 오차로 기록하였으며 'N'은 기록된 세포의 수를 나타내었다. 통계적의미는 Paired t test로 평가하였으며 P value는 0.05 미만을 의미 있는 것으로 간주하였다. Ryanodine은 Agrisystem International (USA)에서 구입하였고 모든 다른 약물들은 Sigma (Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하였다.

Fig. 2. Cells were held at potential of 0 mV and currents were recorded in response to 200 ms voltage steps from -120 to +40 mV in 20 mV increments. A: 2 mM Ca^{2+} . B: Ca^{2+} -free, C: CPA + Ry + Caffeine+ 5-HT, D: Nicardipine.

Fig. 3. The effect of nicardipine on whole cell store-operated channel current activated by CPA, 5-HT, caffeine and ryanodine-induced passive depletion of the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} in PSMCs. A: current-voltage (I-V) relationship of whole cell store-operated channel current in Ca^{2+} -free solution before and after depletion of SR (*: $P < 0.05$). B: I-V relationship of whole cell store-operated channel current after Ca^{2+} depletion of SR in the absence and the presence of nicardipine.

결 과

세포내 calcium 고갈은 store-operated Ca^{2+} current (I_{SOC})를 활성화하였고 IP_3 와 ryanodine에 민감한 세포내 Ca^{2+} 저장소의 동시 고갈은 0 mV 근처에서 역전되는 직선적인 I_{SOC} 를 유도하였다(Fig. 2). 또한 세포내 Ca^{2+} 저장소의 고갈로 인하여 활성화된 I_{SOC} 에 VDCC 차단제인 nifedipine의 투여는 활성화된 I_{SOC} 에 의미있는 변화를 초래하지 않았다(Fig. 3).

고 찰

폐동맥평활근세포에서 세포질의 자유 Ca^{2+} 농도의 증가는 혈관이 L-phenylephrine이나 serotonin같은 혈관활성 작용제에 의해 자극 받았을 때 폐동맥수축을 일으키는 주요 유발 인자이다.¹¹⁾ 다양한 막 수용체의 활성화에서 세포질 Ca^{2+} 증가의 두 근원은 주로 SR인 세포내 Ca^{2+} 저장소와 원형질막에 있는 열린 Ca^{2+} -permeable channels를 통하여 세포로 들어오는 세포외 Ca^{2+} 이다.^{12,13)} 평활근세포의 SR은 Ca^{2+} 저장에 있어 제한된 저장능력으로 인하여 수용체 활성화에 의해 증대된 Ca^{2+} 가동화는 내부 저장을 고갈시켜서 세포외 환경으로부터 Ca^{2+} 의 입장을 통하여 재충전되어야 한다. 작용제가 초래한 Ca^{2+} 유리에 의한 SR의 Ca^{2+} 고갈은 Ca^{2+} 유입을 유발한다.⁷⁾ 저장 고갈에 의해 증대된 CCE는 Ca^{2+} 으로 빈 SR을 재충전하고 세포질[Ca^{2+}]의 지속적인 증가를 유지하는데 중요한 기전이다.^{14,15)} 실험실에서의 단독 혈관평활근세포에서 작용제에 의해 증대된 세포질[Ca^{2+}]의 변화는 SR로부터의 Ca^{2+} 유리에 의한 세포질[Ca^{2+}]의 일시적인 증가와 횡문근형질막(sarcolemmal) Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입에 의한 세포질[Ca^{2+}]의 지속적인 증가로 이루어져 있으며 SOCs,¹⁵⁾ receptor-operated Ca^{2+} channels (ROCs) 그리고 VDCCs 등 최소한 3 분류등급이 있다.¹⁶⁾ 작용제에 의해 초래된 Ca^{2+} 유입은 주로 ROCs의 수용체에 의해 증대된 활성화와 저장고갈에 의해 증대된 SOCs의 활성화에 의해 야기된다.¹³⁻¹⁵⁾ 막탈분극에 의해 증대된 VDCCs의 활성화도 작용제에 의하여 초래된 세포질[Ca^{2+}]의 증가와 관련이 있다.^{12,16)}

평활근세포의 세포내 SR로부터의 Ca^{2+} 의 유리의

중요성은 잘 알려져 있고¹⁷⁻¹⁹⁾ Ca^{2+} 유리는 Ca^{2+} induced Ca^{2+} -release (CICR)이나 1,4,5-triphosphate (IP_3)-induced Ca^{2+} 유리 기전을 통하여 일어날 수 있다. 유리 평활근세포의 SR은 2가지형태의 Ca^{2+} release channels를 갖고 있다. 즉, [Ca^{2+}]의 증가에 의해 활성화되는 ryanodine-sensitive channels과 G-protein-coupled 혹은 tyrosine-coupled membrane bound receptors의 신경호르몬 자극의 downstream에 의해 생성되는 IP_3 에 의해 활성화되는 IP_3 -sensitive channels로 구성되어 있다. Ryanodine 수용체는 CICR의 핵심 요소이며 Ca^{2+} 뿐만 아니라 caffeine에 의해 선택적으로 활성화될 수 있다.²⁰⁾ 약리학적 보고에 의하면 phenylephrine, norepinephrine, serotonin과 ANG II와 같은 많은 다른 작용제들이 IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores로부터 Ca^{2+} 을 유리시킨다고 한다.²¹⁾ 최근 수축 연구와 Ca^{2+} 영상 연구에서는 개의 폐평활근세포의 SR Ca^{2+} 저장소는 독립적으로 작용한다고 하여^{22,23)} 본 실험에서는 IP_3 와 ryanodine-sensitive한 세포내 calcium 저장소의 고갈을 위해서 caffeine, ryanodine, 5-HT와 CPA를 투여하여 SR Ca^{2+} 저장소를 고갈시켰다.

많은 형태의 세포에서 SR Ca^{2+} 저장소의 고갈은 원형질막에 있는 SOCs를 활성화시켜 CCE라고 알려진 과정을 통하여 빈 저장소를 재충전시킨다.⁷⁾ 저장소의 고갈과 연계된 CCE 활성화에 대한 기전은 다양하다. CCE는 SOCs에 연결된 SR-bound IP_3 receptors의 자극을 통하여 활성화될 수 있다.²⁴⁾ 세포질세망 [Endoplasmic reticulum, ER] luminal Ca^{2+} 함량의 감소 또한 직접적인 IP_3 수용체의 자극에 관계없이 CCE를 활성화한다.²⁵⁾ Capacitative influx factor (CIF) 또한 ER [Ca^{2+}] 감소에 의해 ER로부터 유리되어 원형질막에 있는 SOCs를 활성화한다.^{26,27)}

CCE는 고 저항동맥의 혈관평활근세포를 포함하는 많은 형태의 세포에 공통적으로 존재한다. 예를 들면 세포내 Ca^{2+} 저장소의 고갈은 사구체전세동맥 혈관,²⁸⁾ 쥐 폐동맥,²⁹⁾ 인간 폐동맥과³⁰⁾ 돼지 신동맥에³¹⁾ 있는 평활근세포의 CCE 경로를 활성화한다. 비록 최근 보고에서 혈관평활근세포가 CIF에 노출 시 CCE를 활성화시킨다고³²⁾ 하였지만 CCE활성화와 근간이 되는 전도의 기전은 잘 이해되지 않고 있다.³³⁾ SR 저장소로부터 Ca^{2+} 의 유리와 CCE 경로의 활성화는 저산소증에 대한 폐동맥의 독특한 수축반응에 최소한 부분적으로 관계되어 있기에⁵⁾ 폐동맥평활근

의 SR Ca^{2+} 저장소의 작용적 조성과 CCE경로의 더 많은 이해가 특히 중요하다.^{22,29,34)}

폐평활근세포에서 CCE는 여러 생리적 기능을 하는데 전형적으로 CCE는 빈 세포 내 Ca^{2+} 저장소를 재충전시키며³⁵⁾ 최근에는 쥐의 폐동맥 환에서 작용제에 의해 초래된 수축을 촉진시킨다고 하며⁶⁾ 무엇보다도 고 저항폐동맥의 저 산소에 의해 초래된 수축에 CCE가 관여한다고 한다.^{22,29)} CCE는 excitation-contraction coupling뿐만 아니라 세포증식과도 연관이 있다고 한다.³⁰⁾ 또한, T-림프구의 경우 Ca^{2+} 결합 부위가 세포 내가 아니라고 하였다.³⁶⁾ 본 실험에서도 세포 내 calcium 고갈은 I_{SOC} 를 활성화하였고 IP_3 와 ryanodine에 민감한 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 동시 고갈은 0 mV 근처에서 역전되는 직선적인 I_{SOC} 를 유도하였다.

임상적으로 사용되는 calcium 길항제의 주요 군은 1,4-dihydropyridines, phenylalkylamines와 benzothiazepines로 구성되어 있으며 각각의 대표적인 약물로는 nifedipine, verapamil과 diltiazem이다. 이들 약물들은 일차적으로 VDCCs를 통한 Ca^{2+} 유입을 차단함으로써 작용한다. 대부분의 세포들은 VDCCs를 갖고있으며 이들 통로를 통하여 들어간 Ca^{2+} 이 세포 내 사건을 촉발한다. 그러나, 여러 종류의 아형이 존재하며 다른 조직에 따라 다르게 분포한다. 치료적으로 사용되는 Ca^{2+} 길항제는 심근과 평활근에 주로 분포하는 아형을 차단하는데 결과적으로는 생체에서는 심혈관계에 주로 작용한다. 이들 세집단의 Ca^{2+} 길항제는 심장과 혈관에 분포하는 Ca^{2+} 통로를 차단하는데 두 조직에 대한 선택성이 다르다. Verapamil은 심장선택적이며 심방 심실 전도를 방해하여 상심실 빈맥을 억제하며 dihydropyridine Ca^{2+} 길항제는 강력한 혈관 이완제이나 심장에는 거의 영향을 미치지 않는다. Diltiazem은 심장에도 영향을 미치며 혈관이완도 초래한다. 조직 선택성은 같은 집단의 약물 내에서조차도 뚜렷한데 다른 dihydropyridine은 다른 혈관상에 대하여 다른 선택성을 보인다. 예를 들면 nimodipine은 말초혈관보다 뇌혈관에 보다 강력하게 작용하며³⁷⁾ nisoldipine은 상대적으로 관상혈관에 선택적으로 작용한다.³⁸⁾ 또한, 여러 실험에서 phenylalkyl 수용체는 통로의 세포 내 표면에 존재하나^{39,40)} dihydropyridine과^{41,42)} benzothiazepine⁴³⁾ 수용체는 세포 외 표면에 가깝게 존재한다.

Nicardipine은 nifedipine보다 반감기가 더 길며 관상동맥과 뇌혈관에 혈관 선택성을 갖고 있는 1,4-dihydropyridine 계통의 약물로서 1,4-dihydropyridines 중에서 혈관평활근에 가장 강력한 이완제로 작용하며 정맥혈관은 이완 시키지 않고 전신동맥혈관은 이완시킨다. 그러나 폐동맥혈관에 대한 효과는 아직 밝혀지지 않았다.⁴⁴⁾ Nicardipine은 일차적으로 VDCCs를 통한 Ca^{2+} 유입을 차단하는 calcium 길항제로서 작용하며 dihydropyridine 수용체는 세포외부 표면에 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러나, VDCCs는 여러 종류의 아형이 존재하며 다른 조직에 따라 다르게 분포하고 VDCC 차단제들도 조직 특이성이 있어 nicardipine이 모든 VDCCs를 차단하였다고는 볼 수 없으나 본 실험에서 I_{SOC} 를 활성화 시킨 후 투여한 nicardipine은 I_{SOC} 에 의미있는 영향을 미치지 않았다.

결론적으로 개폐동맥평활근세포에서 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 고갈은 I_{SOC} 의 활성화를 야기시키며 활성화된 I_{SOC} 는 VDCC 차단제인 nicardipine에 의해 억제되지 않으므로 개폐동맥평활근세포에는 nicardipine에 의해 차단되는 VDCCs가 결여되어 있거나 CCE에 기여하지 않는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al: An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.
2. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
3. Palevsky HI, Schloo BL, Pietra GG, Weber KT, Janicki JS, Rubin E, et al: Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation* 1989; 80: 1207-21.
4. Wagenvoort CA: Vasoconstriction and medial hypertrophy in pulmonary hypertension. *Circulation* 1960; 22: 535-46.
5. Ward JP, Aaronson PI: Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: Can anyone be right? *Respir Physiol* 1999; 115: 261-71.
6. McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney

- M, Krick S, et al: Capacitative Ca^{2+} entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001; 280: L870-80.
7. Putney JW Jr: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7: 1-12.
8. Berridge MJ: Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995; 312: 1-11.
9. Penner R, Fasolato C, Hoth M: Calcium influx and its control by calcium release. *Neurobiology* 1993; 3: 368-74.
10. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T: Receptor-activated Ca^{2+} influx: How many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 77-83.
11. Doi S, Damron DS, Horibe M, Murray PA: Capacitative Ca^{2+} entry and tyrosine kinase activation in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L118-L130.
12. Davis MJ, Hill MA: Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 1999; 79: 387-423.
13. Tsien RW, Tsien RY: Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 715-60.
14. Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, et al: On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15195-202.
15. Parekh AB, Penner R: Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997; 77: 901-30.
16. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB: Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* 1990; 259: C3-C18.
17. Iino M, Kobayashi T, Endo M: Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 417-22.
18. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, et al: Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 157-230.
19. Somlyo AP: Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res* 1985; 57: 497-507.
20. Zucchi R, Ronca-Testoni S: The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 1-51.
21. Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H: Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 387-573.
22. Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX, Hume JR: Prominent role of intracellular Ca^{2+} release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology* 1997; 122: 21-30.
23. Janiak R, Wilson SM, Montague S, Hume JR: Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C22-C33.
24. Ma HT, Patterson RL, Van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL: Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Science* 2000; 287: 1647-51.
25. Hofer AM, Fasolato C, Pozzan T: Capacitative Ca^{2+} entry is closely linked to the filling state of internal Ca^{2+} stores: a study using simultaneous measurements of ICRCAC and intraluminal $[\text{Ca}^{2+}]$. *Journal of Cell Biology* 1998; 140: 325-34.
26. Putney JW, Bird GS: The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 1993; 75: 199-201.
27. Randriamampita C, Tsien RY: Emptying of intracellular Ca^{2+} stores release a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 1993; 364: 809-14.
28. Fellner SK, Arendshorst WJ: Capacitative calcium entry in smooth muscle cells from preglomerular vessels. *American Journal of Physiology* 1999; 277: F533-42.
29. Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP: Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *Journal of Physiology* 2000; 525: 669-80.
30. Golovina VA: Cell proliferation is associated with enhanced capacitative Ca^{2+} entry in human arterial myocytes. *American Journal of Physiology* 1999; 277: C343-9.
31. Utz J, Eckert R, Trautwein W: Changes of intracellular calcium concentrations by phenylephrine in renal arterial smooth muscle cells. *Pflügers Archiv* 1999; 438: 725-31.
32. Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM: Calcium influx factor (CIF) directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 26158-63.
33. Gibson A, McFadzean I, Wallace P, Wayman CP.

- Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone. Trends in Pharmacological Sciences 1998; 19: 266-9.
34. Dipp M, Evans AM: Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ. Circulation Research 2001; 89: 77-83.
 35. Putney JW, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. Bioessays 1999; 21: 38-46.
 36. Zweifach A, Lewis RS. Calcium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in t lymphocytes. J Gen 1996; 107: 597-610.
 37. Towart R: The selective inhibition of serotonin induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonist dihydropyridines. Circ Res 1981; 48: 650-7.
 38. Godfraind T, Dessy C, Salomone S: A comparison of the potency of selective L-calcium channel blockers in human coronary and internal mammary arteries exposed to serotonin. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263: 112-22.
 39. Hescheler J, Pelzer D, Trube G, Trautwein W: Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside and outside on the cardiac cell membrane?. Pflüg Archiv 1982; 393: 287-92.
 40. Striessnig J, Glossman H, Catterall WA: Identification of a phenylalkylamine binding region within the α_1 subunit of skeletal muscle Ca^{2+} channels. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9108-12.
 41. Kass RS, Arena JP, Chin S: Block of L-type calcium channels by charged dihydropyridine: sensitivity to site of application and calcium. J Gen Physiol. 1991; 98: 63-75.
 42. Striessnig J, Murphy BJ, Catterall WA: Dihydropyridine receptor L-type Ca^{2+} channels: identification of binding domains for [^3H] (+)-PN200-11- and [^3H] azidopine within the α_1 subunit. Pro Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10769-73.
 43. Hering S, Strbing J, Striessnig J, Glossman H: External localisation of agonist dihydropyridine and antagonist benzothiazepine/benzazepine receptor sites in calcium channels of smooth muscle-like (A7r5-cells) and skeletal muscle-like (BC3H₁-cells) cell lines. J Physiol 1993; 459: 255.
 44. Kaplan JA: Cardiac anesthesia. 3rd. Philadelphia, W. B. Saunders company. 1993, pp 112, 1794.
-