

반응성 산소대사물이 심근 미토콘드리아의 칼슘운반에 미치는 영향*

서울대학교 의과대학 약리학교실

김명석 · 이운송 · 홍석찬

= Abstract =

Effects of Reactive Oxygen Metabolite on the Calcium Transport of Cardiac Mitochondria

Myung-Suk Kim, M.D., Yun-Song Lee, M.D. and Seok-Chan Hong, M.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : Intracellular calcium overload is a common final feature of the ischemic-reper-fused heart and mediates the genesis of irreversible cell damage. Reactive oxygen metabolites have been known to play an important role as toxic mediators in myocardial injuries resulting from ischemia and reperfusion. In order to investigate the mechanism of intracellular calcium accumulation in the ischemic-reper-fused myocardium, the present study observed the possible contribution of the reactive oxygen metabolite to the calcium transport of cardiac mitochondria.

Methods : Mitochondria were isolated from rabbit hearts. The effects of a reactive oxygen metabolite, H_2O_2 on calcium uptake and release, redox states of endogenous pyridine nucleotides and glutathiones of mitochondria respiring with succinate were observed. Calcium uptake and release were monitored by dual-wavelength spectrophotometer using a calcium indicator, arse-nazo III. Contents and redox states of pyridine nucleotides and glutathiones were measured by enzymatic methods using spectrofluorometer and HPLC.

Results : Hydrogen peroxide(10–500 μ M) promoted calcium release dose-dependently from Ca^{++} -preloaded mitochondria, but did not affect the mitochondrial calcium uptake. The H_2O_2 -induced calcium release was accompanied by simultaneous oxidation of the pyridine nucleotides and decrease in the content of the reduced form of glutathione(GSH). When mitochondria were treated with BCNU(N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea) to inhibit glutathione reductase and so as to reduce the GSH content, there were no increase in calcium release from the mitochondria. These results may indicate that H_2O_2 increases the permeability of cardiac mito-chondrial membrane to calcium in association with the changes in redox state of endogenous pyridine nucleotides, but not with that of glutathiones.

Conclusion : It is suggested that the reactive oxygen metabolites induce the release of calcium

*이연구는 1992년도 한국과학재단 연구비(과제번호 : 921-1600-007-1)와 1992년도 서울대학교병원 지정진료연구비(과제번호 : 02-92-205) 지원에 의한 결과임.

from mitochondria by altering the redox state of pyridine nucleotides, and it may partly be involved in the elevation of cytosolic calcium concentration in the ischemic-reperfused myocardial cells.

KEY WORDS : Calcium transport · Cardiac mitochondria · H_2O_2 .

서 론

세포내 칼슘농도는 세포막을 통한 세포외액 칼슘의 이동과 sarcoplasmic reticulum, 미토콘드리아 등 세포내 기구들의 칼슘운반에 의하여 조절된다. 심근세포의 경우 sarcoplasmic reticulum은 골격근 세포에 비하여 그 분포가 상대적으로 적은 반면 미토콘드리아는 세포내 막구조물 단백질의 약 35%를 차지할 정도로 풍부히 존재¹⁾하기 때문에 에너지 생산기구로서 뿐 아니라 세포내 칼슘의 저장 및 조절기구로서도 중요한 역할을 할 것으로 인정되고 있다. 심근세포 미토콘드리아의 칼슘운반 능력은 비록 심근의 수축-이완에 관여하는 칼슘을 직접 조절할 수 있을 정도로 빠르지는 못하나 칼슘과의 친화성 및 양적인 면에서의 저장능력은 심근세포내 칼슘농도를 조절하기에 충분하며 특히 세포내 칼슘농도가 크게 증가하는 병적 상태에서는 미토콘드리아의 칼슘운반이 중요한 의미를 갖는다²⁾. 미토콘드리아 내막을 통한 칼슘운반에 있어서 흡수와 유리는 별개의 독립적인 기전에 의하여 일어난다. 즉, 생리적 상태에서 미토콘드리아의 칼슘 흡수는 에너지 의존적이고 ruthenium red에 민감한 Ca^{++} -uniport를 통하여 전적으로 일어나고, 유리는 Na^+ - Ca^{++} 교환 매체 또는 Na^+ -비의존적인 기전들에 의하여 일어난다³⁾.

그러나 병적 상태에서는 미토콘드리아의 칼슘운반 특히 유리기전들에 관하여 아직도 명확히 밝혀져 있지 않다. 간장 또는 심장 미토콘드리아에서 과다한 칼슘축적은 자발적인 칼슘유리를 이르키며 실험적으로 다양한 물질들이 이러한 칼슘유리를 촉진한다. 즉, 고농도의 무기인⁴⁾, Palmitoyl CoA⁵⁾, SH기 반응물질⁶⁾, oxalacetate⁷⁾, t-butyl hydroperoxide^{8,9)}, adriamycin¹⁰⁾ 등이 칼슘을 미리 축적시킨 미토콘드리아에서 Na^+ -비의존적인 칼슘유리를 촉진하며, 이는 미토콘드리아 팽창, 막전위 붕괴 등 내막 투과성의 증가에 동반하여 일어난다고 한다.

그러나 이러한 미토콘드리아 내막의 투과성 증가에 따른 칼슘 유리촉진의 자세한 기전에 관하여는 몇가지 설이 있으나 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 몇몇 연구자들^{7-9,11)}은 내인성 pyridine nucleotide들의 산화-환원 상태가 미토콘드리아 칼슘운반을 조절하는 기전과 관련이 있을것으로 주장하는 한편 다른 연구자들^{6,12)}은 glutathione의 산화-환원상태 변동이 미토콘드리아 내막 투과성을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라고 주장하고 있다.

허혈심근의 관상혈류재개에 따른 심근손상의 악화 즉 재관류손상에서 공통적으로 보이는 병리조직학적인 소견의 하나는 심근손상과 더불어 세포내 칼슘농도가 현저히 증가하는 것이다^{13,14)}. 심근세포의 칼슘농도 증가는 근본적인 기전이 무엇 이건 그 증가 정도와 심근기능의 저하가 상호 비례하는 점으로 보아¹⁵⁾ 재관류 심근에서 나타나는 비가역적인 세포괴사 및 심근손상의 악화도 과다한 세포내 칼슘축적과 관련이 있을 것으로 생각된다¹⁶⁾. 그러나 이러한 재관류심근의 세포내 칼슘농도 증가 기전에 관하여는 아직도 명확치 않다.

한편 허혈 및 재관류 심근세포에서는 미토콘드리아의 칼슘 또한 증가한다. Henry등¹⁷⁾은 가토심근 미토콘드리아의 칼슘농도가 허혈심근에서 3.7배 증가하였고, 허혈후 재관류시에는 7.2배로 더욱 증가한다고 하였으며, Ferrari등¹⁸⁾은 흰쥐 심근 미토콘드리아의 칼슘함량(15 nmole/mg prot.)이 60분 허혈시 22 nmole/mg prot.으로 증가하고 60분 허혈후 재관류시에는 40 nmole/mg prot.으로 더욱 증가함을 관찰하였다. 또한 Peng등¹⁹⁾도 돼지 심근 미토콘드리아의 칼슘(10~14 nmole/mg prot.)이 30분 허혈후 재관류시에는 161 nmole/mg prot.으로 현저히 증가한다고 보고하였다. 이러한 허혈-재관류 심근 미토콘드리아에서의 과다한 칼슘농도 증가는 산화적 인산화(oxidative-phosphorylation)를 억제함으로써 ATP 생성을 감소시킬 뿐 아니라 내막의 투과성도 증가시키므로 칼슘 등 기타 mat-

rix내의 저분자량물질들은 소실시키고 세포내 유리칼슘농도 증가에도 일부 이바지할 수 있을 것으로 여겨진다³⁾.

허혈심근의 재관류시에는 산소대사물인 반응성 산소라디칼들(superoxide anion, O_2^- ; hydrogen peroxide, H_2O_2 ; hydroxyl radical, OH^\cdot)의 생성이 증가하며, 이는 심근세포에 산화성 손상을 야기시키고 나아가 심기능 악화를 초래하는데 상당한 역할을 한다^{20,21)}. 반응성 산소대사물은 여러 출처로부터 다양한 기전에 의하여 생성되나 특히 미토콘드리아는 세포내 기구중 반응성 산소대사물의 가장 중요한 출처로 믿어진다. 미토콘드리아는 심근세포에서 산소소모가 가장 많은 기구로서 정상상태에서도 미토콘드리아 호흡시 소모되는 산소의 약 5% 내외가 산소라디칼의 형태로 일가 환원되며, 내막의 전자전달계중 NADH-CoQ와 CoQ-cytochrome b 단계가 주발생장소로 알려져 있다²²⁻²⁴⁾. 이러한 반응성 산소라디칼의 생성은 정상심근 미토콘드리아에서보다는 허혈-재관류 또는 저산소-산소재공급 심근 미토콘드리아에서 증가된다²⁵⁻²⁷⁾. 생체의 조직세포들에는 반응성 산소대사물 또는 이들의 산화산물에 의한 산화성 손상에 대항하기 위한 기전으로 효소 및 비효소계의 여러가지 항산화 방어체계가 내인성으로 존재한다. 그러한 방어기전들 가운데 하나인 glutathione peroxidase/reductase계는 환원형 glutathione(GSH) 그리고 pyridine nucleotide인 NAD(P)H의 산화와 연결하여 H_2O_2 , 또는 유기과산화물($ROOH$)을 제거하는 기전으로써 정상상태에서 발생하는 소량의 H_2O_2 및 기타 과산화물에 대하여는 효과적인 무독화 작용을 나타내고 조직세포들을 산화성 손상으로 부터 보호한다⁹⁾.

그러나 만일 반응성 산소라디칼을 위시한 산화적 스트레스가 방어체계를 능가할 정도로 많을 경우 조직세포는 산화성 손상을 당할 것이며 이 체계를 구성하는 glutathione 및 pyridine nucleotide들의 산화-환원 상태 또한 변화될 것이다. 이러한 관점에서 볼 때 H_2O_2 및 기타 반응성 산소라디칼의 생성이 증가할 뿐 아니라 내인성 항산화 방어기전도 저하되는 허혈-재관류 심근세포 미토콘드리아에서는 glutathione 및 pyridine nucleotide들의 산화-환원 상태가 필연적으로 정상과는 달리 변동할

것이다²⁸⁻³⁰⁾. 이는 pyridine nucleotide 또는 glutathione의 산화-환원 상태가 미토콘드리아 내막의 투과성을 조절하는데 관여할 것이라는 전술한 주장들을 감안할 때 허혈-재관류 심근 세포에 있어서 미토콘드리아의 칼슘운반 및 세포내 칼슘농도 증가와 그 조절기전의 일부로서도 관여할 가능성을 배제할 수 없다. 본연구는 이러한 관점하에 반응성 산소대사물의 하나인 H_2O_2 가 심근미토콘드리아의 칼슘운반에 미치는 영향, 특히 유리 및 그 기전을 검토함으로써 허혈-재관류 심근의 세포내 칼슘농도 조절기전의 일단을 규명하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

Protease(Nagarse enzyme), rotenone, arsenazo III, ruthenium red, catalase, thiobarbituric acid, NADH, NADPH, 산화형 glutathione(GSSG), 환원형 glutathione(GSH), orthophthalaldehyde 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고 그 이외 시약은 Merck 제품을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 미토콘드리아의 추출

체중 1~1.5kg의 건강한 New Zealand White계 가토를 암수 구별없이 실험동물로 사용하였다. Heparin(1000 IU)을 정맥투여하고 sodium pentobarbital 30mg/kg 정맥주사로 마취한 후 즉시 흉부를 절개하여 심장을 적출하였다. 10mM EGTA가 포함된 냉 sucrose-Tris 완충용액(mM; sucrose 250, Tris 5, EGTA 10, pH 7.2)내에서 심낭 및 지방조직과 심방을 제거한 후 심실근만을 분리하였다. 분리한 심실근으로부터 alkaline bacterial protease(Nagarse enzyme)를 사용한 differential centrifugation 방법으로 미토콘드리아를 추출하였다. 요약하면, nagarse enzyme 1mg/ml, 10mM EGTA가 포함된 냉 sucrose-Tris 용액을 심실근 wet g당 nagarse enzyme이 1mg이 되게 가하여 15분간 0°C에서 잘게 찼다. 0.5% bovine serum albumin이 포함된 냉 sucrose-Tris 완충용액을 첨가한후 glass-teflon homogenizer를 사용하여 10% (w/v) 균질액을 만들었

다. 균질액을 0°C, 1000xg에서 10분간 원심분리하여 혈구, 핵, 조직 편등을 제거하였다.

상층액을 nylon mesh로 여과한 후 0°C, 12,000 xg에서 원심분리하여 미토콘드리아 pellet을 얻었다. 그 pellet에 EGTA를 뺀 sucrose-Tris 완충용액(mM ; sucrose 250, Tris 5, 0.5% BSA, pH 7.2)을 가하여 다시 부유시킨 후 12,000g에서 원심분리하여 세척하였다. 세척은 3회 반복하여 남아있는 EGTA를 제거하였다. 마지막 세척 후 2~3ml의 sucrose-Tris 완충용액을 가하여 최종 단백질농도가 10~15mg/ml가 되도록 부유하였다. 단백질농도는 bovine serum albumin을 표준으로하여 측정하였고 모든 조작은 4°C에서 실시하였다.

2) 미토콘드리아의 칼슘흡수 및 유리

미토콘드리아의 칼슘흡수 및 유리는 칼슘에 선택적인 arsenazo III를 지시약으로 사용하여 dual-wavelength spectrophotometer로 측정하였다. Sucrose-KCl-Tris 완충용액(mM ; sucrose 250, KCl 75, Tris 5, pH 7.2)에 미토콘드리아 분획 0.5mg/ml, KH_2PO_4 1.7mM, arsenazo III 50 μM , rotenone 10 μM 을 첨가하고 호흡기질로는 succinate 5mM을 넣어 incubation 하였다.

3분후 칼슘을 첨가한 다음 685/675nm의 파장에서 dual-wavelength spectrophotometer(Hitachi, Model 557)를 사용하여 흡광도 변화를 추적하므로써 칼슘 흡수와 유리를 측정하였다. 반응은 30°C에서 시행하였으며 실험중 cuvette내 반응액의 산소부족을 방지하기 위하여 100% O_2 를 cuvette위로 불어 넣어 주었다. H_2O_2 의 작용을 관찰한 실험에서는 칼슘 첨가후(1.5~2분) 흡수가 완전히 일어난 다음 10~500 μM H_2O_2 를 첨가하였다.

3) 미토콘드리아 팽창

미토콘드리아 팽창을 spectrophotometer를 사용하여 관찰하였다. 상기의 실험조건중 arsenazo III를 첨가하지 않은 상태에서 칼슘흡수 및 유리를 유도한 후 파장 540nm에서 dual-beam spectrophotometer(Hitachi, Model 557)를 사용하여 흡광도 변화를 기록하였다.

4) Pyridine nucleotide의 산화-환원 및 함량 측정

Pyridine nucleotide의 산화-환원 상태는 spectro-

photometer법으로 추적하였다. 미토콘드리아 팽창을 관찰한 실험에서와 같이 arsenazo III를 첨가하지 않은 조건에서 칼슘 흡수 및 유리를 유도하고 340/370nm에서 dual-wavelength spectrophotometer로 흡광도 변화를 연속 기록하였다. 또한 미토콘드리아의 내인성 NADH와 NADPH 함량을 효소 반응을 이용한 spectrofluorometer법으로 측정하였다³¹⁾. 칼슘흡수 및 유리조건에서 일정시간 incubation한 미토콘드리아 반응액을 1N alcoholic-KOH 용액으로 추출하고 중성화 시킨 후 시료로 사용하였다. 시료 0.2ml를 포함한 50mM phosphate buffer(pH 7.5) 2ml에 0.6mM pyruvate, 0.4U/ml LDH를 첨가한 후 $\lambda_{\text{EX}}=355\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=460\text{nm}$ 에서 spectrofluorometer(Kontron, SFM 25)를 사용하여 형광도 변화를 측정하므로써 NADH 농도를 측정하였고, 이어서 동일 cuvette에 1mM oxidized glutathione(GSSG), 0.4U/ml glutathione reductase를 첨가하여 다시 동일 파장에서 형광도 변화를 기록하므로써 NADPH 농도를 계산하였다.

5) 지질과산화

미토콘드리아의 산화성 손상지표의 하나로 지질과산화 산물인 malondialdehyde(MDA)를 측정하였다. 150mM KCl~5mM Tris 완충액(pH 7.2)에 1mg/ml 미토콘드리아 및 위에서와 같은 농도의 Pi , rotenone, succinate, 칼슘 그리고 H_2O_2 을 첨가한 칼슘흡수 및 유리 조건으로 15분간 incubation 하였다. 일정양의 반응액과 동량의 TBA 용액(0.375% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid in 0.25 N HCl)을 섞어 100°C 열탕에서 20분동안 반응시킨 후 발색물질을 동량의 n-butanol로 추출하여 532nm ($\Sigma_{532}=1.52 \times 10^5 \text{M/cm}$)에서 흡광도를 측정하였다.

6) Malate dehydrogenase 활성도

미토콘드리아 내막의 손상지표로 matrix 효소인 malate dehydrogenase의 반응액으로의 유출을 관찰하였다. 앞에서와 같은 칼슘 흡수 및 유리조건에서 15분간 반응시킨 미토콘드리아 반응액을 원심분리한 후 그 상층액에서 효소활성을 측정하였다.

0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 0.25mM NADH, 0.2mM oxaloacetate에 앞에서 원심분리하여 얻은 상층액을 넣은 후 25°C, 340nm에서 흡광도의 저하를 spectrophotometer(Hewlett-Packard, 8452A)로

측정하였다. $\Delta A_{340}/\text{min}$ 는 첫 3분내의 흡광도 변화가 직선적인 부위를 취하였으며 25°C, pH 7.4에서 1 μmole 의 NADH($\Sigma_{340}=6.317 \times 10^3/\text{M}/\text{cm}$)를 1분에 산화시키는 활성도를 1 unit로 계산하였다.

7) Glutathione 측정

형광성인 glutathione(reduced, GSH)-orthophthaldehyde(OPA) 복합물질을 HPLC로 분리하여 fluorometry하는 방법으로 미토콘드리아의 glutathione 함량을 측정하였다³²⁾. 칼슘흡수 및 유리조건의 미토콘드리아(1mg/ml) 반응액(2ml)에 0.9 μM perchloric acid(200 μl)를 가하여 제단백 시켰다. 제단백 시료 100 μl 에 25mM dithiothreitol(DTT) 100 μl , 0.1 μM Tris(pH 8.5) 50 μl 를 가하여 산화형 glutathione (GSSG)를 전부 환원 시킨 후 동량의 OPA용액(5 mg/ml)을 가하여 형광을 나타내는 glutathione-OPA 복합물을 만들었다. 그 복합물을 HPLC로 분리하고 형광도를 측정하여 총 glutathione(GSSX)양을 측정하였다.

또한 제단백 시료(850 μl)에 2mM n-ethyl maleimide(NEM) 50 μl , 0.1 μM Tris(pH 8.5) 50 μl 를 가하여 GSH를 먼저 제거한 후 다시 50mM DTT 50 μl 를 가하여 disulfide를 환원시키고 OPA 복합체를 만들므로서 산화형 glutathione(GSSG) 양을 측정하였다. 환원형 glutathione(GSH)은 총 glutathione에서 GSSG양을 빼주므로서 계산하였다. HPLC는 Gilson Model 303 pump, RP 18 guard column(Waters), 15cm Nova-pack(Particle size ; 4 μ , Waters)와 fluorometer(Gilson, Model 121)를 사용하였고, $\lambda_{\text{EX}}=340\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=430\sim 460\text{nm}$ 에서 형광도를 측정하였다. Mobile phase는 0.15 μM sodium acetate (pH 7.0) 96%와 methanol 4%이었고 flow rate는 1.5ml/min이었다.

결 과

1. 칼슘흡수 및 유리에 대한 H_2O_2 의 영향

Rotenone으로 NADH-관련호흡(step 1)을 억제하고 succinate를 기질로 사용한 가토 심근 미토콘드리아에서 칼슘흡수 및 유리를 관찰하였다. 첨가한 칼슘(100 nmole/mg prot.)은 신속하고 완전하게 흡수되었으며, 칼슘이 축적된 미토콘드리아는 시

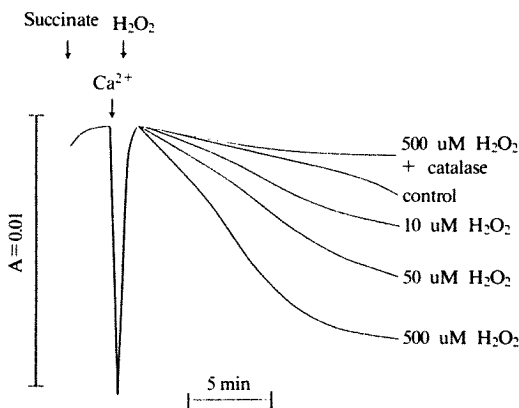


Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide on calcium retention in isolated rabbit heart mitochondria. Mitochondria (0.5mg/ml) were incubated aerobically in the medium containing 250mM sucrose, 75mM KCl, 5mM Tris(pH 7.2), 1.7mM KH_2PO_4 , 10 μM rotenone and 50 μM arsenazo III at 30°C. At the indicated times, succinate(5mM), CaCl_2 (100 nmole/mg prot.), H_2O_2 and catalase(1 μM) were added. Absorbance change was recorded with a dual-wavelength spectrophotometer at the wavelength-pair of 685—675nm.

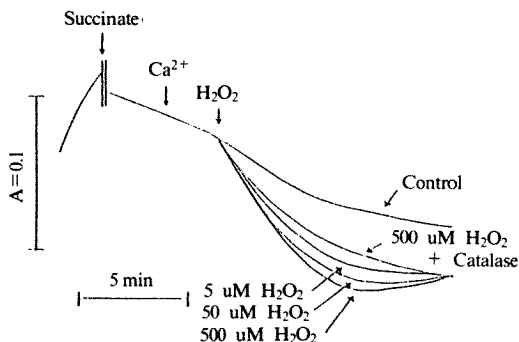


Fig. 2. Effect of hydrogen peroxide on mitochondrial swelling. Experimental conditions were as same as in Fig. 1 except for the absence of arsenazo III. Mitochondrial swelling was observed spectrophotometrically at 540nm.

간이 지남에 따라 다시 자발적인 유리를 보였다. 칼슘흡수는 H_2O_2 에 의하여 영향을 받지 않았으나 유리는 H_2O_2 (10~500 μM)에 의하여 촉진 되었으며 첨가한 H_2O_2 양이 많을수록 농도 의존적으로 더욱 증가하였다. H_2O_2 에 의한 칼슘유리 촉진은 초기에 빠른 속도로 일어나고 시간경과에 따라 유리속도가 지연되는 이상성 반응을 보였으며, H_2O_2 분해효

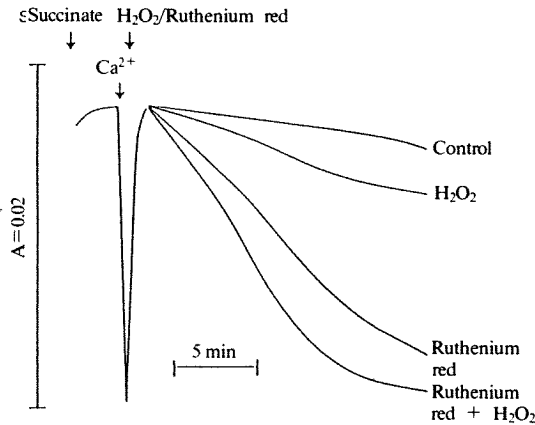


Fig. 3. Effect of hydrogen peroxide on calcium retention in isolated rabbit heart mitochondria treated with ruthenium red. Experimental conditions were as same as in Fig. 1. Ruthenium red(2 nmole/mg prot.) was simultaneously added with the application of H_2O_2 (50 μ M) just after completion of calcium uptake.

소인 catalase에 의하여 유리촉진이 거의 완전히 억제되었다(Fig. 1). H_2O_2 에 의한 칼슘유리촉진은 Fig. 2에서와 같이 미토콘드리아의 팽창을 동반하였고 이역시 H_2O_2 농도에 의존적이었으며 catalase에 의하여 억제되었다. 한편 유리반응시 미토콘드리아의 Ca^{++} -uniport를 통한 흡수를 억제하는 ruthenium red(2 nmole/mg prot.)를 처리한 경우에서도 H_2O_2 에 의한 칼슘유리 촉진은 같은 정도로 일어났다(Fig. 3). 이는 H_2O_2 가 자발적으로 유리된 칼슘의 재흡수를 방지하므로써 마치 유리가 증가되는 것처럼 보이는 것이 아니고 별도의 기전을 통하여 유리를 촉진하는 것임을 나타내는 결과로 여겨진다.

2. H_2O_2 에 의한 칼슘유리 촉진 기전

1) 미토콘드리아 막의 산화성 손상

H_2O_2 는 막구조물 지질성분을 과산화 하므로써 미토콘드리아 내, 외막에 산화성 손상을 야기하고 투과성을 증가시킬 수 있기 때문에 그 가능성을 일차적으로 검토하였다. Fig. 4에서와 같이 칼슘유리조건에서 지질과산화 산물의 하나인 malondialdehyde(MDA) 생성은 대조군에서 1.57 ± 0.12 nmoles/mg prot.이었으며, H_2O_2 첨가(50 μ M)에 의한 유리촉진 조건에서 도 1.68 ± 0.11 nmoles/mg

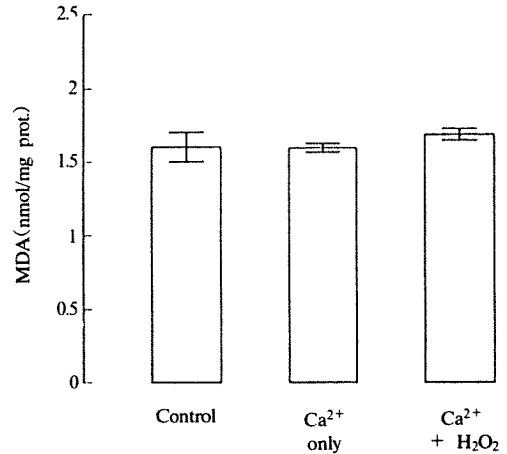


Fig. 4. Lipid peroxidation in Ca^{++} -preloaded mitochondria incubated with H_2O_2 . Mitochondria(1mg/ml) were incubated for 15 min with the addition of H_2O_2 (50 μ M) as same as in Fig. 1. After incubation, malondialdehyde(MDA) was measured by thiobarbituric acid as described in the Methods.

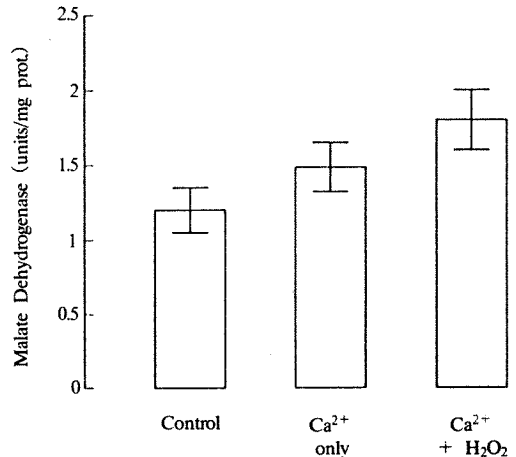


Fig. 5. Release of malate dehydrogenase from Ca^{++} -preloaded mitochondria incubated with H_2O_2 . Conditions of mitochondrial incubation were as same as in Fig. 4. Activity of malate dehydrogenase released into the reaction medium was measured by enzymatic method as described in the Method.

prot.으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 같은 조건에서 matrix 효소의 하나로 미토콘드리아 표지 효소인 malate dehydrogenase의 유리도 대조군에서 1.45 ± 0.67 U/mg prot, H_2O_2 첨가군에 서는 $1.72 \pm 0.$

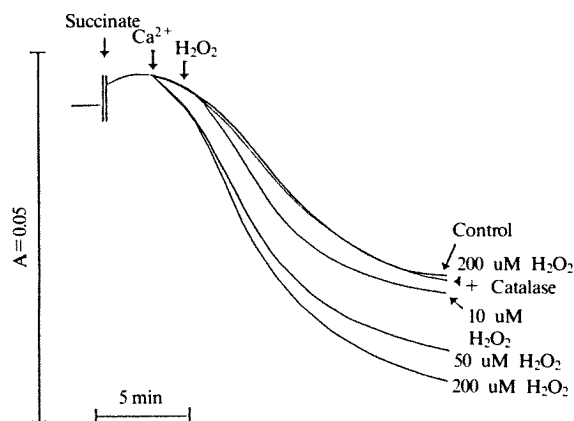


Fig. 6. Effect of hydrogen peroxide on the redox state of mitochondrial pyridine nucleotides. Experiments were done as in Fig. 1 except for the absence of arsenazo III. Redox states of pyridine nucleotides were monitored spectrophotometrically by using a dual-wavelength spectrophotometer at the wavelength-pair of 340–370nm.

76U/mg prot.로 통계학적으로는 유의한 증가를 보이지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과로 볼 때 본 연구에서 채택한 농도의 H_2O_2 는 미토콘드리아막의 산화성 손상에 따른 투과성 증가 때문에 칼슘유리를 촉진하는 것은 아닐것으로 사료되었다.

2) Pyridine nucleotide의 산화-환원 및 함량 변화

내인성 pyridine nucleotide의 산화-환원 상태는 칼슘유리 조건에서 산화방향으로 진행되었으며 이는 H_2O_2 첨가에 의하여 더욱 촉진되었다. 이러한 pyridine nucleotide의 산화는 칼슘유리 촉진에서와 같이 H_2O_2 의 농도에 의존적으로 더욱 증가 되었으며 catalase에 의하여 억제되었다(Fig. 6). 한편 칼슘 흡수 및 유리 조건에서 15분간 반응시킨 후 미토콘드리아의 내인성 NADH 및 NADPH 함량을 효소방법으로 또한 측정하였다. Fig. 7에서와 같이 H_2O_2 를 첨가하지 않은 대조군에서 NADH 함량은 6.91 ± 0.69 nmole/mg prot.인데 비하여 H_2O_2 (50 μ M) 첨가로 칼슘유리를 촉진시킨 군에서는 5.24 ± 0.71 nmole/mg prot.으로 유의한 감소를 보였다. 그러나 NADPH 함량은 NADH의 약 1/5 정도였고 두군간에도 차이를 보이지 않았다.

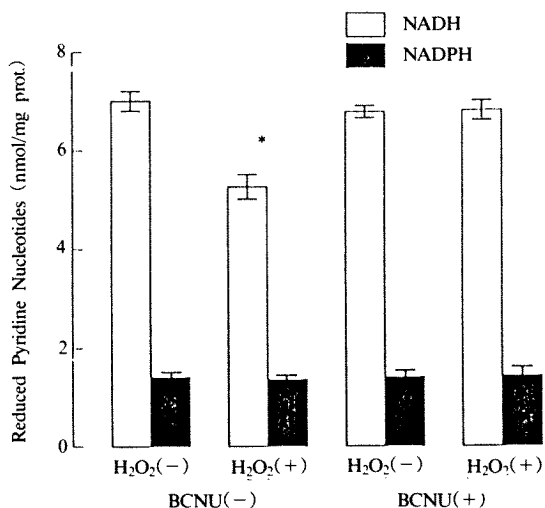


Fig. 7. Effects of hydrogen peroxide on NAD(P)H contents of mitochondria. Control and BCNU-treated (100 nmole/mg prot.) mitochondria were incubated with H_2O_2 (50 μ M). Determinations of NAD(P)H were done enzymatically as described in the Method. *: $P < 0.05$ by Student t-test.

3) Glutathione의 산화-환원 및 함량 변화

위에서와 같은 칼슘 흡수 및 유리조건에서 15분간 반응시킨 미토콘드리아의 환원형 glutathione (GSH) 함량은 대조에서 3.74 ± 0.76 nmole/mg prot.이었으나, H_2O_2 (50 μ M)에 의하여 칼슘유리가 촉진된 상황에서는 2.60 ± 0.34 nmole/mg prot.으로 유의하게 감소하였다. 한편 산화형과 환원형의 총 glutathione에 대한 GSH의 비(GSSX/GSH)는 H_2O_2 첨가 조건에서 약간 증가 양상을 보이나 두군사이에 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 8).

4) H_2O_2 -촉진 칼슘유리에 대한 BCNU의 영향

BCNU(N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea)는 glutathione reductase를 억제하는 약물로 glutathione peroxidase/reductase 항산화 방어체계에서 NAD(P)H 산화와 연결된 GSSG에서 GSH로의 환원을 억제한다. 본 연구에서는 H_2O_2 에 의한 미토콘드리아의 칼슘유리촉진에 있어서 pyridine nucleotide와 glutathione의 관련성을 구별하여 검토하기 위하여 BCNU의 영향을 관찰하였다.

BCNU 처리는 미토 콘드리아의 NAD(P)H에는 변화 없이(Fig. 7) GSH는 감소하고 GSSX/GSH비는

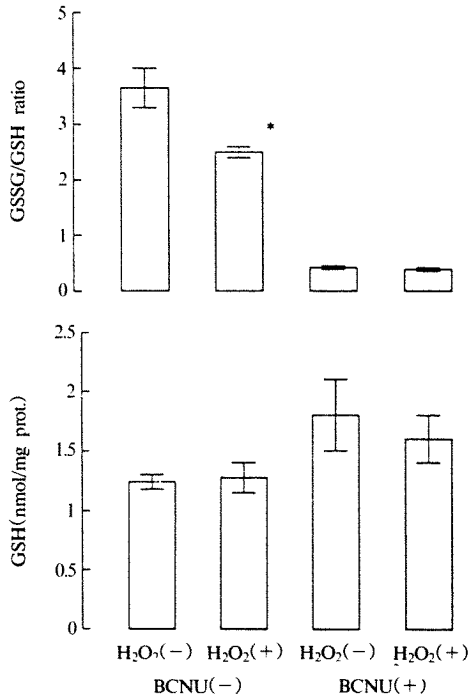


Fig. 8. Effects of hydrogen peroxide on GSH contents and GSSX/GSH ratio of mitochondria. Control and BCNU-treated(100 nmole/mg prot.) mitochondria were incubated with H₂O₂(50μM). Determinations of GSH and GSSX were done by HPLC method as described in the Method. *: P<0.05 by Student t-test.

증가시켰다(Fig. 8). Fig. 9에서와 같이 BCNU(100 μM)를 30분전에 전처리한 후 칼슘 흡수 및 유리를 관찰한바 흡수에는 전혀 영향이 없었고 자발적인 칼슘유리 및 H₂O₂에 의한 유리도 증가하지 않았다.

고 안

많은 종류의 내인성 및 외인성 물질들이 미토콘드리아 내막의 칼슘에 대한 투과성을 증가시킴이 알려져 있으나⁴⁻¹⁰⁾ 그 기전에 관하여는 논란이 많다. 본연구에서 반응성 산소대사물의 하나인 H₂O₂는 칼슘을 미리 축적시킨 가토 심근 미토콘드리아에서 Na⁺-비의존적인 칼슘유리를 촉진하였다. H₂O₂는 정상 미토콘드리아에서도 호흡과정에서 생성되나 허혈-재관류심근 미토콘드리아에서는 그 생성이 더욱 증가되며 미토콘드리아에 산화성 손상을 가할수 있다. H₂O₂에 의하여 있을 수 있는 미토콘

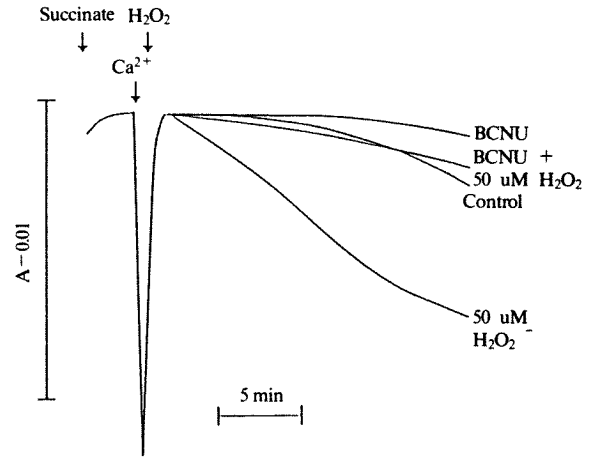


Fig. 9. Effect of hydrogen peroxide on calcium retention in BCNU-treated mitochondria. Mitochondria(1 mg/ml) were pretreated with BCNU(100 nmole/mg prot.) for 30 min just before the experiment. Calcium uptake and release was measured as same as in Fig. 1.

드리아 내외막의 산화성 손상은 matrix내의 각종 거대분자들을 포함하여 칼슘에 대한 투과성도 비특이적으로 증가시킬 수 있다. 그러나 본 연구조건에서 검토한 H₂O₂ 농도(10~500μM)에서는 산화성 손상의 지표인 MDA 생성이나 matrix효소인 malate dehydrogenase의 유리가 유의하게 증가하지 않은 것으로 볼 때 H₂O₂에 의한 칼슘 유리 증가는 내막의 산화성 손상에 따른 비특이적인 투과성 증가의 결과는 아닐 것으로 여겨졌다.

Lehninger등⁷⁾은 미토콘드리아의 내인성 NAD(P)H가 oxalacetate에 의하여 산화될 때 칼슘유리가 촉진되고, 반대로 β-hydroxybutyrate에 의하여 NAD(P)가 다시 환원될 때는 칼슘유리가 방지된다고 보고하였으며, 또한 Lotscher등^{8,9)}은 유기과산화물의 하나인 t-butylhydroperoxide(t-BHP)가 환원된 미토콘드리아에서 NAD(P)H 산화와 더불어 칼슘유리를 촉진하는 데 이러한 현상이 selenium 결핍으로 glutathione peroxidase 활성이 저하된 미토콘드리아에서는 나타나지 않는다고 보고하였다. 이들은 이러한 결과로부터 t-BHP가 glutathione peroxidase/reductase 체계에 의하여 대사될 때 pyridine nucleotide들의 산화-환원 상태를 변화시키고 이러한 작용이 미토콘드리아의 칼슘운반조절에 관여할 것이라고 주장하였다. 본연구에서 H₂O₂는 칼

칼슘유리 촉진과 더 불어 pyridine nucleotide의 산화-환원 상태를 산화 방향으로 진행시켰을 뿐 아니라 NADH 함량을 또한 현저히 저하시켰다.

이러한 결과는 H_2O_2 역시 glutathione peroxidase/reductase 항산화 방어계에 의하여 제거됨을 감안할 때 심근 미토콘드리아의 H_2O_2 에 의한 칼슘유리 촉진에 있어서도 pyridine nucleotide들의 산화가 관련되리라 여겨진다. 그러나 이러한 pyridine nucleotide의 산화가 미토콘드리아 내막의 칼슘투과성을 증가시키는 자세한 기전에 관하여는 아직도 명확치는 않다. Hofstetter등¹¹⁾은 칼슘축적 미토콘드리아에서 첨가한 과산화수물이 pyridine nucleotide들의 가수분해를 촉진하고 아마도 그 분해산물인 ADP-ribose가 미토콘드리아 막단백에 공유결합함으로써 내막 투과성을 증가 시킬 것이라고 주장하였으나 논란이 있다.

미토콘드리아내막의 칼슘투과성을 높임에 있어서 내인성 glutathione의 산화-환원 상태가 관련이 있다는 주장도 있다. Beatrice등¹²⁾, Pfeiffer등⁶⁾은 칼슘이 축적된 흰쥐 간세포 미토콘드리아에서 nitrofurantoin, rhein들이 GSH 감소, GSSG 증가에 동반하여 칼슘을 유리하며, 이때 t-BHP 첨가는 GSSG/GSH 비율을 더욱 크게 하면서 칼슘유리를 촉진함을 관찰하고 GSH 함량이 높을 때는 미토콘드리아 내막의 칼슘투과성이 높아지지 않으나 GSH가 GSSG로 산화될 때는 투과성이 높아진다고 보고하였다. 이들은 GSSG/GSH 비는 미토콘드리아막의 기능적 SH group들의 산화-환원 상태를 조절하므로서 lysophospholipid acyl transferase 활성을 조절하고 따라서 칼슘-의존적인 phospholipase A_2 활성화에 의한 미토콘드리아 내막 투과성을 또한 조절할 수 있을 것이라고 주장하였다.

그러나 본연구에서는 glutathione의 산화-환원 상태가 H_2O_2 에 의한 칼슘 투과성 증가와는 관계가 없을 것으로 여겨졌다. 즉 BCNU 전처리로 glutathione reductase를 억제하므로서 GSH의 감소 및 GSSG/GSH 비의 증가를 유도한 상황에서도 칼슘유리가 현저하지 않았을 뿐 아니라 H_2O_2 에 의하여 촉진되지도 않았다. 이러한 결과는 심근 미토콘드리아에서 H_2O_2 에 의한 칼슘유리 촉진은 glutathione의 산화-환원 상태변동과 직접적인 상관관계는 없을 것으로 여겨지게 한다. 이는 BCNU로

전처리 한 흰쥐의 분리 간세포에서 t-BHP가 extra-mitochondria 칼슘저장고로부터의 칼슘유리는 촉진하나 미토콘드리아에서의 칼슘유리는 촉진하지 않았다는 Bellomo³³⁾의 보고 및 간세포 미토콘드리아에서 과산화수물에 의한 산화적 스트레스시 미토콘드리아막의 칼슘투과성 증가와 GSH 농도와는 직접적인 관계가 없다는 보고³⁴⁾와도 유사하다.

개의 허혈심근 미토콘드리아에서 NADH 산화에 동반하여 칼슘유리가 촉진된다는 보고³⁵⁾, 그리고 반응성 산소라디칼을 생성함으로써 심근손상을 야기하는 adriamycin이 흰쥐 심근 미토콘드리아에서 미토콘드리아 팽창, 막전위붕괴, pyridine nucleotide 산화와 더불어 칼슘 유리를 촉진한다는 보고¹⁰⁾들이 있다. 이와 함께 본 연구에서 칼슘을 미리 축적시킨 심근 미토콘드리아의 칼슘유리가 pyridine nucleotide의 산화와 동반하여 H_2O_2 에 의하여 촉진 된다는 것은 허혈-재관류 심근세포의 칼슘농도 증가 및 그 기전을 설명하는데 있어서 의의가 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

허혈-재관류 심근세포는 세포질내 유리칼슘의 과다한 축적을 보이며, 이러한 세포내 칼슘축적은 비가역적인 심근손상을 촉진한다. 허혈심근의 재관류시에는 반응성산소대사물의 생성이 증가하며, 이는 재관류 심근손상 발생에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본연구는 허혈-재관류 심근세포의 칼슘농도 증가기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 세포내 칼슘조절기구로서 중요한 역할을 하는 미토콘드리아의 칼슘운반에 있어서 반응성 산소대사물의 영향 및 그 기전을 검토하였다.

방 법 :

미토콘드리아는 토끼심근에서 차등 원심분리법으로 추출하였다. 반응성 산소대사물의 하나인 과산화수소(H_2O_2)가 succinate를 호흡기질로 이용한 미토콘드리아의 칼슘흡수 및 유리, 내인성 pyridine nucleotide와 glutathione의 함량 및 산화-환원상태에 미치는 영향을 검토하였다. 칼슘흡수 및 유리는 arsenazo III를 이용하여 dual-wavelength spect-

rophotometer법으로 측정하였고, pyridine nucleotide와 glutathione은 spectrofluorometer와 HPLC를 사용하여 효소방법으로 측정하였다.

결 과 :

H_2O_2 (10~500 μ M)는 미토콘드리아의 칼슘흡수에는 영향을 미치지 않으나 칼슘이 미리 축적된 미토콘드리아에서의 자발적인 칼슘유리는 농도의 존적으로 촉진시켰으며, 이는 catalase에 의하여 억제되었다. H_2O_2 는 칼슘유리촉진시 내인성 pyridine nucleotide들의 산화-환원상태를 산화방향으로 유도하였고, 또한 환원형 glutathione(GSH)의 함량을 감소시켰다. 한편 glutathione reductase 활성을 억제하는 BCNU(N,N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea)를 처리한 미토콘드리아에서는 GSH함량의 감소에도 불구하고 칼슘유리촉진이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 H_2O_2 가 glutathione보다는 pyridine nucleotide들의 산화-환원상태를 변화시키므로써 미토콘드리아 내막의 칼슘투과성에 영향을 미칠것임을 시사하는 바를 여겨졌다.

결 론 :

반응성 산소대사물은 내인성 pyridine nucleotide의 산화와 관련하여 심근 미토콘드리아로부터 칼슘유리를 촉진하고, 이는 세포질내 칼슘농도 증가에 일부 관여할 것으로 사료된다.

References

- 1) Page E, McCallister LP : *Quantitative electronmicroscopic description of heart muscle cell. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts.* Am J Cardiol 31 : 172-181, 1973
- 2) Born GVR, Cuatrecasas P, Herken H, Schwartz A : *Calcium in Drug Actions. In Handbook of Experimental Pharmacology. vol 83, Springer, Verlag, Berlin, 1988*
- 3) Crompton M : *The effect of ruthenium red and other agents on mitochondrial calcium metabolism. In : Handbook of Experimental Pharmacology. Calcium in Drug Actions. Vol 83. p185, Springer, Verlag, Berlin. 1988*
- 4) Beatrice MC, Palmer JW, Pfeiffer DR : *The relationship between mitochondrial membrane permeability and the retention of Ca^{2+} by mitochondria.* J. Biol Chem 255(25) : 8663-8671, 1980

- 5) Palmer JW, Pfeiffer DR : *The control of Ca^{++} release from heart mitochondria.* J Biol Chem 256 : 6742-6750, 1981.
- 6) Pfeiffer DR, Kaufman RF, Lardy HA : *Effect of N-ethylmaleimide on the limited uptake of Ca^{2+} , Mn^{2+} and Sr^{2+} by rat liver mitochondria.* J Biol Chem. 253(12) : 4165-4171, 1978
- 7) Lehninger A, Vercesi A, Bababunmi EA : *Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides.* Proc Natl Acad Sci USA 75 : 1690-1694, 1978
- 8) Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter C : *Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria.* J Biol Chem 255(19) : 9325-9330, 1980
- 9) Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter C : *Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria.* Proc Natl Acad Sci USA 76(9) : 4340-4344, 1979
- 10) Sokolove P, Shinaberry R : *Na^+ -independent release of Ca^{2+} from rat heart mitochondria.* Biochem Pharmacol 37(5) : 803-812, 1988
- 11) Hofstetter W, Muhlebach T, Lotscher HR, Winterhalter KH, Richter C : *ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria.* Eur J Biochem 117 : 361-367, 1981
- 12) Beatrice MC, Stiers DL, Pfeiffer DR : *The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria.* J Biol Chem 259(2) : 1279-1287, 1984
- 13) Nayler WG, Papagiotopoulos S, Elz JS, Daly MJ : *Calcium-mediated damage during post-ischemic reperfusion.* J Mol Cell Cardiol 29(Suppl II) : 41-54, 1988
- 14) Poole-Wilson PA, Harding DP, Bourdillon PDV, Tones MA : *Calcium out of control.* J Mol Cell Cardiol 16 : 175-187, 1984
- 15) Bourdillon PD, Poole-Wilson PA : *The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium.* Cir Res 50 : 360-368, 1982
- 16) Farber JL : *Biology of disease : Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis.* Lab Invest 47 : 114-123, 1982
- 17) Henry PD, Schuchleib R, Davis R, Weiss ES, Sobel

- BD : *Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial Ca^{++} in ischemic rabbit heart*. *Am J Physiol* 233 : H677-H684, 1977
- 18) Ferrari R, diLisa F, Raddino R, Visoli O : *The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischemic reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol* 14 : 737-740, 1982
 - 19) Peng C, Kane JJ, Staub KD, Murphy ML : *Improvement of myocardial energy production in ischemic myocardium by in vivo infusion of ruthenium red*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2 : 45-54, 1980
 - 20) Hess ML, Manson NH : *Molecular oxygen : Friend and Foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury*. *J Mol Cell Cardiol* 16 : 969-985, 1984
 - 21) Simpson PJ, Lucchesi BR : *Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury*. *J Lab Clin Med* 110 : 13-30, 1987
 - 22) Boveris A, Chance B : *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. *Biochem J* 134 : 707-716, 1973
 - 23) Forman HJ, Boveris A : *Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria*. In *Free Radicals in Biology*. Vol. V. p65-90. Academic Press, London, 1982
 - 24) Loschen G, Azzi A : *On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria*. In *Recent Advances in Studies on cardiac Structure and Metabolism*. Vol 7, p3-12. University Park Press, Baltimore, 1976
 - 25) Leyck S, Parnuum MJ : *The cellular origin of oxygen free radical species*. *Documentation of International Conference on Oxygen Free radicals In Health and Disease*, London, 1988
 - 26) Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A, Kagawa T : *In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury*. *Cir Res* 55 : 168-175, 1984
 - 27) Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD : *Hyperoxia increases H_2O_2 release by lung mitochondria and microsomes*. *Arch Biochem Biophys* 217 : 411-421, 1982
 - 28) Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, Visioli O : *Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion : Role of the cellular defences against oxygen toxicity*. *J Mol Cell Cardiol* 17 : 937-945, 1985
 - 29) Kim MS, Park JW, Kim YS, Chung MH, Lee DK : *A study on the mechanism of myocardial ischemic-reperfusion injury : The role of oxygen-free radicals in hypoxic-reoxygenation injury in isolated cardiomyocyte of rat*. *Seoul J Med* 30 : 231-242, 1989
 - 30) Shlafer M, Myers CL, Adkins S : *Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia*. *J Mol Cell Cardiol* 19 : 1195-1206, 1987
 - 31) Klingenberg M : *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VII. 3rd Ed. p251-284. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1985
 - 32) Neuschwander-Teri BA, Roll FJ : *Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct*. *Anal Biochem* 179 : 236-241, 1989
 - 33) Bellomo G, Jewell SH, Thor H, Orrenius S : *Regulation of intracellular calcium compartmentation : Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide*. *Proc Natl Acad USA* 79 : 6842-6846, 1982
 - 34) Carbonera D, Azzone GF : *Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress*. *Biochim Biophys Acta* 943 : 245-255, 1988
 - 35) Sordahl LA, Stewart ML : *Mechanism(s) of altered mitochondrial calcium transport in acutely ischemic canine hearts*. *Cir Res* 47 : 814-820, 1980