

## 고양이를 이용한 허혈성 전조치모델에서 Adenosine과 Protein Kinase C의 역할에 대한 연구\*

영남대학교 의과대학 내과학교실  
김영조 · 신동구 · 박종선 · 최교원 · 심봉섭

### = Abstract =

#### The Role of the Adenosine Receptor Subtypes and Protein Kinase C in Ischemic Preconditioning in the in Vivo Cat Heart

Young Jo Kim, M.D., Dong Gu Shin, M.D., Jong Seon Park, M.D.,  
Kyo Won Choi, M.D., Bong Sub Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea*

**Background :** It is well known that ischemic preconditioning protects the heart against infarction or arrhythmias from a subsequent ischemic injury. Recent laboratory data indicate that the adenosine during the ischemic period may trigger protection via A1 or A3 adenosine receptor and also protein kinase C(PKC) plays a central role. This study was designed to determine the role of adenosine receptor subtypes and PKC in the preconditioning protection.

**Methods :** All cat heart groups were subjected to 40min ischemia and 30min reperfusion. The preconditioning protocol consists of 5min ischemia and then 10min of reperfusion 4 times. The effects of ischemic preconditioning, nonselective adenosine receptor blocker(SPT), an A1 specific antagonist(DPCPX) and protein kinase C inhibitor(Polymyxin B), on ischemic preconditioning were determined by infarction size. There were 5 groups : (1) control group (Group 1, n=10)(2) Ischemic preconditioned group(Group 2, n=9)(3) DPCPX pretreatment group(Group 3, n=6)(4) SPT pretreatment group(Group 3, n=6)(5) Polymyxin B pretreatment group(Group 5, n=6). SPT and DPCPX were given intravenously 5 min before ischemic preconditioning. Polymyxin B was administered to cats for 30min during ischemic preconditioning period.

**Results :** Ischemic preconditioning only or pretreatment with DPCPX prior to preconditioning demonstrated a significant reduction in infarct size( $22.6 \pm 1.5$ ,  $25.4 \pm 0.9\%$  infarction of the risk zone, respectively,  $p < 0.05$ ) with respect to control, SPT-pretreatment, and polymyxin B-pretreatment groups( $44.0 \pm 1.7$ ,  $43.0 \pm 2.0$  and  $40.3 \pm 0.4\%$  infarction of the risk zone, respectively).

**Conclusions :** Ischemic preconditioning protects heart from subsequent ischemia. Protection was blocked by SPT and protein kinase C inhibitor(polymyxin B), but not by A1 antagonist DPCPX. The cardioprotective effects by ischemic preconditioning in the in vivo cat heart

---

\*본 연구는 영남대학교 의료원 의학 연구비의 일부보조로 이루어 졌음.

appear to be dependent on A3 adenosine receptors and activation of protein kinase C.

**KEY WORDS :** Ischemic preconditioning · Adenosine receptors · Protein kinase C · Myocardial protection.

## 서 론

1985년 Murry등<sup>1)</sup>은 개의 심장에서 반복적이고 일시적인 관상동맥결찰후 지속적인 심근허혈시 심근경색의 크기가 감소하는 것을 보고하였다. 이러한 일시적이고 가역적인 심근허혈로 인한 심근보호효과를 허혈성 전조치(Ischemic Preconditioning)이라 한다. 허혈성전조치가 심근보호에 작용하는 기전은 잘 알려져 있지 않으나 토끼, 개, 쥐 등을 이용한 여러 동물연구에서 adenosine이 가장 중요한 내인성 매개체로 보고되고 있다<sup>2,5)</sup>. 다수의 보고자들은 adenosine의 작용기전이 A1 adenosine 수용체를 활성화시켜 심근보호작용을 나타내며 이러한 작용은 A1 수용체를 선택적으로 자극하거나 길항하는 약물을 투여하여 허혈성 전조치와 같은 효과를 나타내거나 억제할수 있는 것으로 보고하고 있다<sup>2,3,5)</sup>. 반면에 Stephen 등<sup>6)</sup>은 토끼를 이용한 분리심근모델에서 A1이 아닌 A3 adenosine receptor agonist만이 심근보호효과가 있다고 발표하여 adenosine의 작용기전이 A3 adenosine receptor와의 관련성을 제시하였다. Lui와 Downey등<sup>7)</sup>은 쥐에서 adenosine이나 adenosine 동족체를 투여하여 심근보호효과를 얻었으나 adenosine antagonist로 이러한 효과를 막을수 없다고 보고하였다. 또한 Liu와 Kloner<sup>8)</sup>, Cave등<sup>9)</sup>은 쥐를 이용한 실험에서 adenosine으로 전조치의 효과를 얻을수 없다고 보고하였다. 이것은 쥐에서 adenosine이 전조치의 매개체이기는 하나 다른 매개체 즉 noradrenaline이 더 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며<sup>10,11)</sup> 뿐만아니라 adenosine 수용체의 특이성에도 차이가 있음을 알 수 있다. 이러한 여러 매개체에 의한 세포내 신호전달체계에 있어서 Protein kinase C(PKC)가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. Ytrehus등<sup>12)</sup>은 adenosine이나 noradrenaline과 같은 내인성 매개체가 G protein linked receptor를 자극하여 세포내 신호전달체계를 시작하며 궁극적으로 PKC를 활성화시키는 것으로 제시하였으며 PKC 억제제인 polymyxin B, staurosporine등으로 토끼의 전조치모델에서 심근보호효과를 억제할수 있었다고 보고하고 있다.

이 연구의 목적은 고양이를 이용한 허혈성 전조치모델에서 심근보호효과와 adenosine의 관계 및 adenosine의 작용에 있어서 adenosine 수용체의 특이성을 규명하고 세포내 전달체계에서 PKC의 관련여부를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 준비

실험동물은 평균체중 3.1kg(2.5~4.0kg)의 건강한 고양이 37마리를 암수 구별없이 사용하였다. 실험동물의 마취는 체중 kg당 2mg의 ketamine을 정맥주사하여 마취유도를 하였고 필요에 따라 체중 kg당 1mg을 수시로 정맥주사하여 마취를 유지시켰다. 마취된 고양이는 자발호흡동안 실험대위에 양와위로 고정하고 기관절제를 시행한 후 내경 5mm의 기도내관으로 기도를 확보하고 인공호흡장치(Harvard model 607 respirator)를 사용하여 호흡을 유지하였다. 기계호흡은 실내공기로 양압인공호흡을 실시하여 동맥혈의 PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, pH 및 체온을 각각 25~30mmHg, 80mmHg 이상, 7.35~7.40, 36~37℃정도로 유지시켰다.

검상돌기에서 흉골좌연을 따라 제 2늑골까지 절개하여 개흉한 후 심막을 절개하여 심막요람을 만들었다. 심전도는 사지유도를 통해 표준심전도(유도 II)를 지속적으로 기록하였다. 동맥압 측정 및 약물의 주입을 위해 각각 대퇴동맥, 대퇴정맥을 23G silastic needle로 삽관하였고 좌심실압 및 좌심실압 변화속도(dP/dT치)의 측정은 경동맥을 통해 5F 소아용심도자(5F pediatric polyvinyl catheter)를 역행적으로 좌심실내에 삽입하여 기록하였다. 실험중 삽입된 도관의 폐쇄 혹은 좌전하행지 결찰후 혈전에 의한 관상동맥폐색을 방지하기 위하여 heparin을 kg당 1000U를 정맥주사하고 간헐적으로 heparinized saline액(10U/cc)으로 도관을 세척하였다. 심전도 및 각 혈액학적 측정치는 MP100WS, BIOPAC system을 이용하여 Acqknowledge 881 컴퓨터 프로그램을 이용하여 컴퓨터에 기록저장하였다.

## 2. 관상동맥폐쇄 및 재관류

경색부위 및 크기를 일정하게 하기 위해서 관상동맥 좌전하행지의 기시부에서 3~5mm 정도원위부에서 동맥 손상없이 3~0 견사로 동맥주위를 펜 후 길이 1cm, 직경 3mm 정도의 폴리에틸렌관을 통해서 견사를 넣은 다음 견사끝을 겹자로 줌으로써 혈류 차단을 유도하였으며 혈관의 폐쇄 및 재관류 여부는 육안으로 심근색깔의 변화 및 심전도상 ST절의 변화로 판단하였다. 모든 실험군에서 관상동맥폐쇄와 재관류로 발생할 수 있는 치명적인 부정맥을 예방하기 위해서 관동맥결찰전에 2% lidocaine을 체중 kg당 2mg으로 전처치하였다.

실험준비가 끝난 후 혈압 및 맥박이 안정될 때까지 20분간 기다렸다가 실험을 시작하였다.

## 3. 사용된 약물

Adenosine nonselective antagonist로 8-p-sulphophenyl theophylline(SPT), A1 receptor antagonist로 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX) (이상 Research Biomedicals Inc, Natick, Mass.) 를 사용하였다. Protein Kinase C inhibitor인 Polymyxin B, 심근위험부위 및 괴사부위를 결정하기 위한 염색약으로 Triphenyl tetrazolium chloride(TTC), Nitroblue tetrazolium(NBT)(이상 Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)을 사용하였다.

## 4. 실험방법

허혈성전조건의 방법은 5분간의 관동맥결찰후 10분간 재관류하는것을 4회반복하여 유도하였으며 심근경색은 40분허혈 후 30분 재관류시켜 유도하였고, 허혈성전조건의 시행유무와 시행전 사용된 전처치약물에 따라 그림 1과 같이 다섯군으로 나누었다. DPCPX, SPT는 각각 체중 kg당 1.0mg, 7.5mg을 허혈성전조건 5분전 정맥 주사하였고, polymyxin B는 kg당 24mg을 허혈성 전 조치시작 10분 후부터 30분간 정맥주사하였다.

## 5. 혈액학적 지수측정

심박동수, 좌심실 수축기압, 좌심실압 최대 dP/dT치, 최소 dP/dT치를 전처치전, 관상동맥결찰 30분후, 재관류 30분후 각각 5분간 측정하여 평균치를 구하였다.

## 6. 심근괴사부위 및 위험지역 측정

실험이 끝난 각 동물의 심장은 생체내 위험지역을 결

정하기 위해 다시 관상동맥을 겹자로 조여 재폐쇄시킨후 5% Evans blue 30ml를 대퇴정맥으로 주입하였다. 염화칼륨으로 심장을 정지시킨 후 즉시 심장을 적출하여 냉각된 생리식염수로 관상동맥 및 심실내강을 세척한후 좌심실만을 분리하였다. 분리된 좌심실의 무게를 측정한 후 심첨부에서 시작하여 방실간구(atrio-ventricular groove)에 평행하게 2~3mm의 간격으로 절단하여 5개의 절편을 만들고 각 절편의 무게를 측정하였다. 각 절편에서 위험지역의 %면적을 구하기 위해 각절단면은 심첨부 방향이 위로 오게 해서 사진촬영하였다. 이후 각 절편에서 심근괴사부위의 면적을 측정하기 위해서 tetrazolium을 사용하였으며 각 절편을 pH7.4, 37℃, 0.1% TTC용액에 15분간 부화시키고 다시 상기방법으로 사진촬영하였다. 좌심실에 대한 허혈위험부위 및 괴사면적은 각각 Evans blue 및 TTC 염색에 의해 염색이 안된 부위를 면적측정기를 이용하여 각절단면의 전체 면적당 %면적으로 계산하고 좌심실 전체무게에 대한 각 절편의 무게의 비를 곱한 후 이를 합산하여 좌심실전체중 위험지역 및 경색부위의 크기를 결정하였다.

$$\text{Infarct size(\%)} = \frac{\sum \text{infarct weight in each slice}}{\text{Total LV weight}} \times 100$$

## 7. 통계처리

모든 자료는 평균값과 표준오차로 표시하였고 자료의 통계처리는 SPSS/PC<sup>+</sup> 통계처리 프로그램을 이용하였다. 각 군간의 평균치의 비교는 분산분석(ANOVA) 및 unpaired t-test, 각 군내의 시간대별 평균치의 비교는 paired t-test를 이용하였으며 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

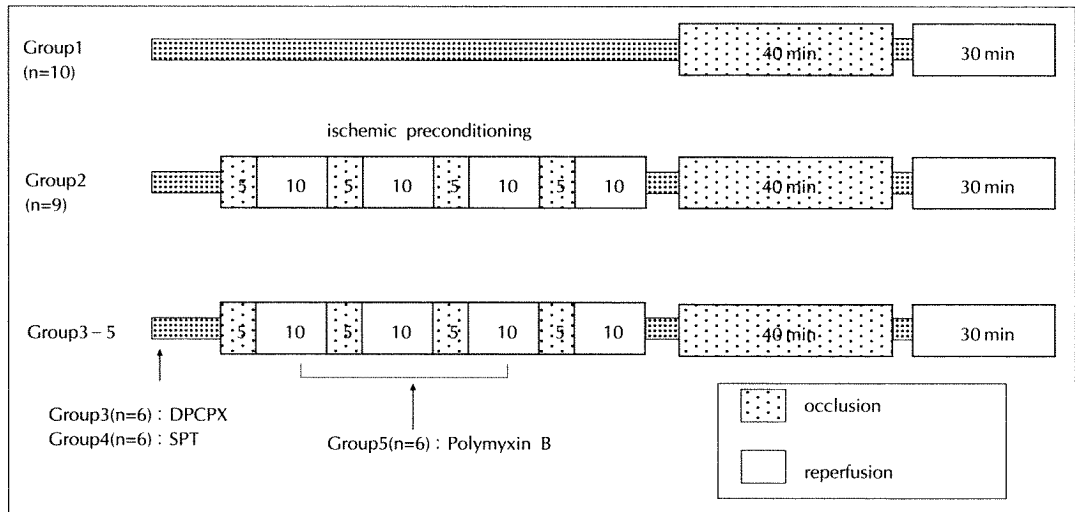
### 1. 혈액학적 지수

평균심박수는 실험단계에 따라 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 각군간에 유의한 차이는 없었다. 좌심실 수축기압 역시 실험단계에 따라 감소하는 경향을 보였으며 기저상태 및 관동맥 결찰후는 각군간에 유의한 차이는 없었으나 재관류후에는 대조군의 93±7mmHg에 비해 허혈성 전조치군에서 122±6mmHg로 대조군보다 높은 좌심실 수축기압을 보였다(P<0.05). 좌심실

**Table 1.** The change of hemodynamic profiles in each experimental groups

Group	Heart rate(bpm)			LVSP(mmHg)			Max dP/dT(mmHg/sec)			Min dP/dT(mmHg/sec)		
	B	O	R	B	O	R	B	O	R	B	O	R
Group 1	219±13	184±11	156±10	191±10	144±7	93±7	1240±70	800±50	480±60	1300±100	750±50	380±40
Group 2	226±11	193±8	174±5	180±11	127±3	122±6*	1220±70	820±40	720±60*	1180±100	720±50	590±60"
Group 3	209±11	182±10	164±8	222±16	184±22	152±24	1410±130	980±90	770±90*	1560±170	1300±150	610±80"
Group 4	218±8	198±10	160±9	210±12	149±19	126±19	1440±110	880±100	630±110	1410±150	930±20	510±100
Group 5	181±34	180±7	171±7	196±14	140±8	140±8	1280±110	810±60	580±60	1270±140	920±80	490±60

Group 1 : control, Group 2 : ischemic preconditioning only, Group 3 : DPCPX pretreated, Group 4 : SPT pretreated, Group 5 : polymyxin B pretreated, B : basal, O : occlusion, R : reperfusion, LVSP : left ventricular systolic pressure.

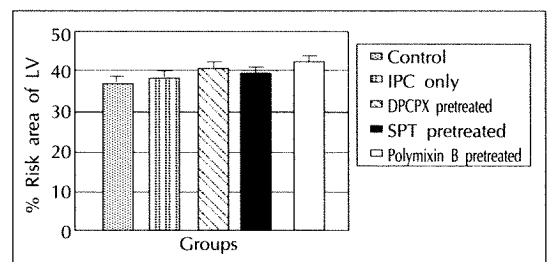


**Fig. 1.** Schematic diagram of the experimental protocol.

최대dP/dT는 기저치, 관동맥 결찰후는 각군간에 유의한 차이는 없었으나 재관류후에는 대조군의 480±60mmHg/sec 보다 허혈성 전조치군 및 DPCPX 전처치군에서 각각 720±60mmHg/sec, 770±90mmHg/sec로 대조군보다 유의하게 높게 나타났으며( $P < 0.05$ ), 좌심실 최소dP/dT 역시 재관류후에만 대조군의 380±40mmHg/sec 보다 허혈성 전조치군 및 DPCPX 전처치군에서 각각 590±60mmHg/sec, 610±80mmHg/sec로 대조군보다 유의하게 높게 나타났다(각각 $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )(Table 1).

## 2. 위험지역 및 경색지역의 크기

각군의 좌심실에 대한 위험지역의 크기는 각각 37.3±0.7%, 38.6±0.9%, 40.3±1.3%, 39.7±2.5%, 41.6±2.4%로 각군간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 2). 한편



**Fig. 2.** The difference of risk area size between groups. There was no significant difference between groups.

각군의 위험부위에 대한 경색부위의 크기는 대조군 44.0±1.7%, 허혈성 전조치군 22.6±1.5%, DPCPX 전처치군 25.4±0.9%, SPT 전처치군 43.0±2.0%, 그리고 Polymyxin B 전처치군 40.3±0.4%로 허혈성 전조치군 및 DPCPX 전처치군은 대조군에 비해 유의한 경색지역의 감소를 보였으나 SPT 전처치군 및 Polymyxin

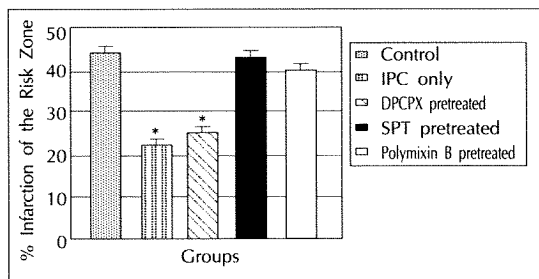


Fig. 3. The difference of infarct size between groups.  
\*p < 0.05 vs. group control, SPT, Polymixin B

B 전처치군에서는 대조군과 통계적으로 유의한 경색지역의 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

## 고 찰

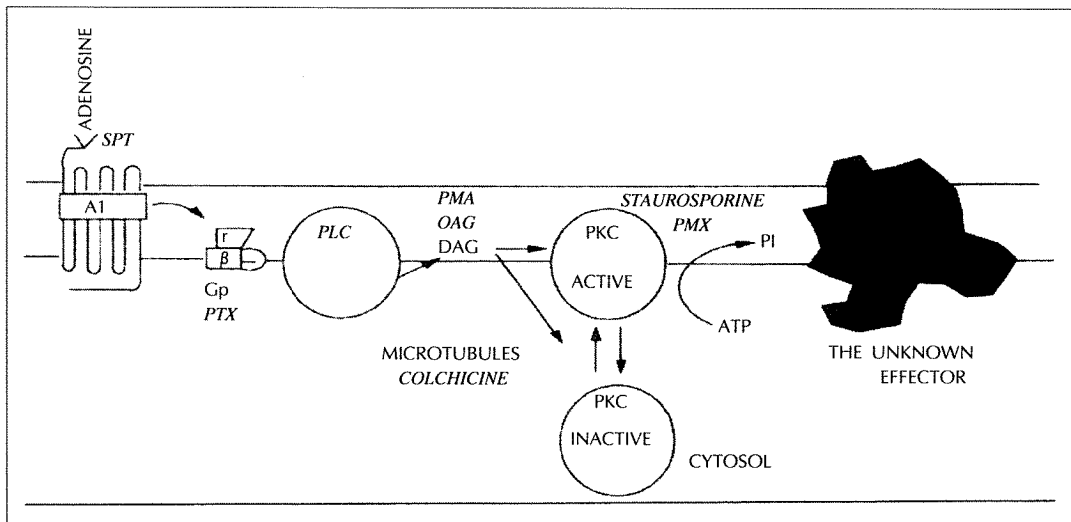
일시적인 심근허혈이 속발하는 지속적 심근허혈시 심근손상을 감소시키는 현상을 허혈성 전조치(Ischemic Preconditioning)이라 한다. 이러한 전조치의 효과는 관상동맥의 일시적인 폐쇄, 심조율을 이용한 허혈<sup>13)</sup>, 저산소증<sup>14)</sup>등으로 유도할 수 있으며 adenosine이나 adenosine agonist를 투여하여 같은 효과를 얻을 수 있다<sup>3, 4)</sup>. 또한 분리된 심근세포에서 특정기질이 부재조건하에서 일시적으로 부화한 결과 허혈성 전조치와 같은 허혈성 심근손상을 감소시키는 효과가 관찰되며 이것을 대사성 전조치라 부르기도 한다<sup>15)</sup>. 허혈성 전조치의 심근보호작용으로 재관류 심부정맥의 감소, 허혈성 심근손상의 감소 등의 심근보호작용은 여러 연구에서 알려졌다나 심근보호기전이나 임상에서 치료적 이용에 대해서는 아직 논란이 있다. 본 연구에서도 허혈성 전조치군에서 대조군의  $44.0 \pm 1.7\%$ 보다 유의하게 낮은  $22.6 \pm 1.5\%$ 의 위험지역 심근괴사율을 보여 허혈성 전조치가 허혈성 심근손상을 감소시키는 것으로 나타났다. 여러 연구자들에 의해 보고되는 심근보호기전은 심근 에너지대사의 변화, 스트레스 유도성 단백질, ATP-감수성 칼륨통로, 그리고 adenosine등이 있다. Adenosine은 ATP생성을 초과한 대사로 인해 심근허혈 수초내 다량으로 생성되어 분비되며<sup>16)</sup> 관상동맥혈류증가에 의한 허혈성 심근손상 감소작용<sup>17)</sup>, 유리산소기나 단백질분해효소 분비의 억제<sup>18)</sup>, 호중구와 혈관내피와의 결합억제<sup>19)</sup> 등의 작용을 가지고 있으며 최근의 보고들은 이 adenosine과 심근보호효과의 연관성을 설명하고 있다. Liu등<sup>5)</sup>은 비특이성 ade-

nosine 수용체 차단제인 SPT를 허혈성 전조치 5분전에 투여하여 adenosine 수용체를 차단한 결과 대조군, 허혈성 전조치군, SPT 전처치후 허혈성 전조치를 시행한 군에서 각각 38%, 9%, 39%의 위험지역내 심근경색을 보였으며 Stephen등<sup>15)</sup> 토끼의 심근을 SPT로 전처치하여 glucose-free preincubation후 허혈성 심근손상을 유발한 결과 전조치의 심근보호효과가 차단되었음을 보고하였다. 한편 Zhenhai등<sup>20)</sup>은 관상동맥내 adenosine을 주입하여 허혈성 전조치와 같은 심근보호효과를 보고하여 adenosine과 전조치의 심근보호작용과의 관련성을 제시하였다. 그러나 몇몇의 연구에 따르면 여러 동물의 종에 따라 보호기전의 차이를 보고하고 있다. 토끼나 개에서는 adenosine이나 adenosine antagonist로 전조치 효과가 유도되거나 차단되며 A1 adenosine 수용체가 전조치를 유도하는 것으로 보고되며<sup>2)</sup> Liu와 Downey등<sup>7)</sup>은 쥐에서 adenosine이나 adenosine 유사체로 보호효과를 유도하였으나 adenosine antagonist로 차단되지 않았으며 Kloner등<sup>8)</sup>, Cave등<sup>9)</sup>은 adenosine으로 쥐에서 전조치효과를 얻을 수 없음을 보고하였다. 그러므로 쥐에서는 adenosine이 전조치와 관련이 있으나 이외 noradrenaline과 같은 다른 매개체가 전조치와 더 관련이 있음을 시사한다<sup>10, 11)</sup>. 본 연구에서도 지속적 심근허혈 전에 비특이성 adenosine 수용체 차단제인 SPT를 정맥내 투여한 결과 대조군의  $44.0 \pm 1.7\%$ 과 유사한  $43 \pm 2.0\%$ 의 위험지역 괴사율을 보여 adenosine의 심근보호효과를 차단할 수 있었다. Adenosine 수용체는 A1, A2 adenosine 수용체로 분류되며<sup>21)</sup>, A2 수용체는 자극성 단백질(Gs)과 결합하며 심근세포내에는 존재하지 않는다<sup>22)</sup>. A1 adenosine수용체는 다양한 G protein(Gi, Go) 및 adenylyl cyclase, phospholipase C, 여러 이온통로와 같은 다양한 효과기(effector)와 결합한다<sup>23, 24)</sup>. A1 adenosine 수용체는 adenosine agonist나 adenosine antagonist에 대한 상대적인 강도에 따라 A1, A3 수용체로 세분되며 alky-lxanthine antagonist인 DPCPX는 A3 수용체와는 미약한 결합력을 보이나 A1 수용체를 억제하는 작용은 대단히 강하다. 그러나 adenosine 수용체는 신경, 혈관, 간질조직, 심근등 여러 조직에 존재하고 다양한 G protein과 결합하므로 어떤 조직, G protein이 심근보호작용과 관계있는지 단정하기는 어렵다. 이러한 여러 가지 adenosine 수용체 아형중에서 허혈성 전조치와 관

련된 심근보호효과를 유도하고 지속시키는데 관여된 수용체에 대해서는 아직 논란이 있다. Liu등<sup>5)</sup>은 토끼의 심장에서 선택적 A1 adenosine 수용체 agonist인 N<sup>6</sup>-1-(phenyl-2R-isopropyl)adenosine(R-PIA)를 관동맥 내로 주입하여 허혈성 전조치와 같은 심근보호효과가 A1 adenosine 수용체와 관계있음을 보고하였다. Sephen등<sup>6)</sup>은 토끼의 분리심근에서 R-PIA의 A1 선택적 농도인 1 $\mu$ M는 심세포 보호효과를 관찰할 수 없었으나 A3 수용체와 결합하는 100 $\mu$ M에서는 전조치와 같은 효과를 보였으며 선택적 A2 adenosine 수용체 agonist인 2-p-(2-carboxyethyl) phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamido adenosine HCl(CGS 12680)로 전처치한 결과 심세포 보호효과는 없음을 보고였다. Sephen등<sup>6)</sup>은 또한 선택적 A1 adenosine 수용체 antagonist인 DPCPX로 당결핍성 전조치의 심근보호효과를 차단하지 못하며 A3 adenosine 수용체가 전조치와 관련된 심근세포의 보호효과와 관련있음을 보고하였다. 본 연구에서도 비선택적 adenosine 수용체 차단제인 SPT를 전처치한 군에서는 43 $\pm$ 2%, 선택적 A1 adenosine 수용체 차단제인 DPCPX를 전처치한 군에서는 25.4 $\pm$ 0.9%의 위험지역 괴사율을 보여 고양이에

서 허혈성 전조치의 심근보호효과가 A3 adenosine 수용체와 관계있음을 간접적으로 시사하였다. 그러나 A2 adenosine 수용체의 호중구기능 억제에 의한 재관류시 심근보호효과와의 관련성을 완전히 배제하지는 못한다.

Protein kinase C는 많은 세포내 신호변환에 중요한 역할을 하며 최근에는 PKC가 허혈성 전조치의 심근보호효과에 중심적 역할을 하는 것으로 제시되고 있다. Ytrehus등<sup>12)</sup>은 adenosine이나 noradrenaline이 G-protein-linked receptor에 작용하여 세포내 PKC를 활성화하여 effector protein의 인산화에 기여하는 것으로 제시하였다. PKC는 세포내 신호전달체계에서의 작용뿐만 아니라 세포증식과 분화조절<sup>25)</sup>, 종양촉진, 발암<sup>26)</sup>에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 cytosolic PKC는 비활성 상태에 있으며 자극으로 인해 세포막으로 전위되어 활성화 된다. PKC의 활성화는 폐포내에서 여러 단백질을 인산화시켜 여러가지 생체계의 변화를 야기한다. 토끼를 이용한 실험에서 심근보호는 허혈시 생성되는 adenosine이 A1 adenosine 수용체를 활성화하여 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>1,5)</sup>. 제시되고 있는 생체내 변화에 따르면 A1 adenosine 수용체는 pertussis toxin-sensitive G protein과 결합하며 G protein은



**Fig. 4.** A summary of the intracellular signalling pathways potentially involved in preconditioning.

The A<sub>1</sub> adenosine receptor couples to the G protein, G<sub>p</sub> and activates phospholipase C(PLC), which degrades phospholipid in the membrane to diacylglycerol(DAG). DAG in turn activates protein kinase C(PKC) that is in the membrane and also causes translocation of PKC from the cytosol to the membrane. During ischemia, phosphorylation of an unidentified protein mediates the actual protection. PTX, pertussis toxin; SPT, 8-p-sulphophenyl theophylline; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; OAG, oleoylacetyl-glycerol; PMX, polymyxin B(Reproduced from Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM: Ischemic preconditioning: the concept of endogenous cardioprotection. DICM 148: 147, 1994).

adenyl cyclase,  $K^+$ 와  $Ca^{++}$  channel, phospholipase를 조절하는 기능을 가진다<sup>27,29)</sup>. Phospholipase C 활성도는 phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, phosphatidyl choline을 분해시켜 이차 전달체인 diacylglycerol(DAG)과 D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate( $Ins(1,4,5)P_3$ )를 생성하며 증가된 diacylglycerol(DAG)은 세포막에서 protein kinase C를 활성화시키고 비활성화된 cytosolic PKC를 세포막으로 전위시켜 활성화시키며 이 활성화된 PKC는 아직 밝혀지지 않은 세포내의 단백질을 serine/threonine 인산화시켜 변화시킨다<sup>30)</sup>(Fig. 4). 현재 protein kinase C의 인산화과정의 대상이 되는 세포성분은 확실히 알려지지 않으나 이온통로, 수용체, 효소, cytoskeletal component등으로 추정된다. 많은 연구들은 5'-nucleotidase<sup>31,32)</sup>, ATP sensitive potassium channel<sup>33-35)</sup>등이 현재 허혈성 전조건의 심근보호작용과 관계된 최종단백질로 제시하고 있다. Potassium channel opener인 nicorandil<sup>36)</sup>, pinacidil<sup>37)</sup>등이 심근보호작용이 있다는 연구들은 매우 흥미있는 일이며 최근에 Auchampach와 Gross등<sup>38)</sup>은 개의 심장에서 ATP-sensitive potassium channel blocker인 glibenclamide로 전조치의 효과를 차단하였다고 보고하고 있다. Ytrehus등<sup>12)</sup>은 토끼의 생체모델에서 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 또는 1-oleyl-2-acetyl glycerol(OAG) 등과 같은 PKC 활성화제와 staurosporine이나 polymyxin B와 같은 PKC 억제제를 이용하여 PKC가 전조치의 보호효과를 야기한다고 발표하였으며 Speechly-Dick등<sup>39)</sup>은 쥐를 이용한 전조치 모델에서 PKC agonist인 1,2-dioctanoyl-m-glycerol(DOC)를 지속적 심근허혈 10분전에 투여하여 허혈성 전조치와 같이 심근괴사를 줄일수 있었으며 허혈성 전조치후 PKC antagonist인 chelerythrine을 지속적 심근허혈 2분전에 투여하여 전조치의 심근보호효과를 상쇄시킴을 보고하여 허혈성 전조치의 심근보호효과가 PKC와 관계있음을 보고하였다. 한편 Thornton등<sup>40)</sup>은 쥐를 이용한 허혈성 심근모델에서 norepinephrine에 노출된 심근은 전조치와 같은 심근보호효과를 나타내 norepinephrine이  $\alpha_1$  수용체를 통한 protein kinase C와의 결합이 심근보호효과와 관련이 있음을 주장하였다. 한편 Przyklenk등<sup>41)</sup>은 개를 이용한 허혈성 심근모델에서 PKC 억제제인 H-7과 polymyxin B로 전조치의 효과를 감소시킬수 없다고 보고

하였다. 이러한 상이한 결과들은 종에 따른 세포내 신호 전달체계의 상이성으로 생각된다. Polymyxin B는 phosphatidylserine과 경쟁적으로 작용하여 protein kinase C의 작용을 억제한다<sup>42,43)</sup>. protein kinase C가 활성화되면 혈관의 평활근을 수축시키므로 protein kinase C의 억제는 혈관을 이완시키며 혈압강화효과를 나타내기도 한다. 본 연구에서도 Speechly-Dick등<sup>39)</sup>의 주장과 같이 PKC를 효과적으로 차단하기 위하여 PKC가 세포막으로 이동할 시기를 고려하여 허혈성 전조치 시작 10분후부터 30분간 투여하였다. 토끼를 이용한 여러 보고들과 같이<sup>3,5,12)</sup> 고양이 생체심장을 이용한 본 연구에서도 PKC antagonist인 polymyxin B를 허혈성 전조치후 지속적 심근허혈 전에 투여하여 허혈성 전조치의 심근보호효과를 차단할수 있었으며 이것은 허혈성 전조치동안 adenosine 수용체 활성화를 통한 protein kinase C의 활성화가 고양이에서 허혈성 전조치의 심근보호효과와 관련이 있음을 시사한다.

결론적으로 일시적인 관동맥 결찰을 이용한 고양이의 허혈성 전조치 모델에서 허혈성 심근손상에 대한 심근보호효과는 A3 adenosine 수용체를 통한 protein kinase C의 활성화와 관련이 있는 것으로 생각되며 어떠한 단백질의 인산화가 심근보호효과와 관련이 있는지에 대해서는 더 많은 연구가 요구된다.

## 요 약

### 연구배경 :

허혈성 전조건의 심근보호작용은 여러 동물실험에서 잘 알려져 있다. 심근보호작용의 작용기전으로 adenosine이 가장 유력한 매개체로 제시되고 있으며 adenosine 수용체의 활성화를 통한 세포내 protein kinase C 활성화로 잘 알려지지 않은 최종 단백질의 인산화가 주작용기전으로 제시되고 있다. 그러나 A1, A2, 그리고 A3 adenosine 수용체중 어떤 수용체가 심근보호작용에 관여하는지와 세포내 신호전달체계에 대해서는 다양한 보고가 있으며 종에따라 작용기전의 상이성도 보고되고 있다. 본 연구는 고양이에서 허혈성 전조건의 심근보호작용에 관여하는 adenosine 수용체 아형을 알아보고 세포내 매개체로서 protein kinase C의 역할을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

## 방 법 :

잡종 고양이 37마리를 대조군, 허혈성 전조건군, 및 전조건군 전치치군(SPT : nonselective adenosine antagonist, DPCPX : A1 selective adenosine antagonist, Polymyxin B : protein kinase C inhibitor)으로 나누었으며 대조군을 제외한 모든군에서 군에 따른 조건을 시행후 관상동맥을 결찰하여 40분간 심근허혈을 유도한후 30분간 재관류후 위험지역에 대한 경색지역을 측정하였다.

## 결 과 :

허혈성 전조건군 및 DPCPX 전조치군에서 대조군에 비해 경색의 크기가 유의하게 작았으며( $22.6 \pm 1.5$ ,  $25.4 \pm 0.9\%$  vs.  $44.0 \pm 1.7\%$ ,  $p < 0.05$ ), SPT 및 polymyxin B 전조치군은 대조군과 경색크기의 차이가 없었다( $43.0 \pm 2.0$ ,  $40.3 \pm 0.4\%$  vs.  $44.0 \pm 1.7\%$ ).

## 결 론 :

고양이에서 허혈성 전조건은 지속적 심근허혈에 대한 심근보호작용을 가지며 이러한 심근보호효과는 A3 adenosine 수용체를 통한 protein kinase C의 활성화와 관련이 있을 것으로 생각된다.

## References

- 1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : *Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation* 74 : 1124-1136, 1986
- 2) Lawson CS, Downey JM : *Preconditioning : state of the art myocardial protection. Cardiovasc Res* 27 : 542-550, 1993
- 3) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM : *Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. Circulation* 85 : 659-665, 1992
- 4) Toombs CF, McGee DS, Johnston WE, Vinton-Johanson J : *Myocardial protective effects of adenosine : infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. Circulation* 86 : 986-994, 1992
- 5) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM : *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation* 84 : 350-356, 1991
- 6) Sephen A, Charles EG : *Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes : evidence of A3 receptor involvement. Cardiovasc Res* 28 : 1049-1056, 1994
- 7) Liu Y, Downey J : *Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. Am J Physiol* 263 : H1107-H1112, 1992
- 8) Liu Y, Kloner RA : *The cardioprotective effects of ischemic preconditioning are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. Circulation* 87 : 1642-1648, 1993
- 9) Cave AC, Collis CS, Downey JM, Hearse DJ : *Improved functional recovery by ischaemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischaemic isolated rat heart. Cardiovasc Res* 27 : 663-668, 1993
- 10) Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ : *Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium. Circulation* 88 : 2351-2358, 1993
- 11) Locke-winter CR, Winter CB, Nelson DW, Banerjee A : *cAMP stimulation facilitates preconditioning against ischemia-reperfusion through norepinephrine and  $\alpha_1$  mechanisms. Circulation* 84(suppl II) : II-433, Abstract
- 12) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM : *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol* 266 : H1145-H1152, 1994
- 13) Walker DM, Yellon DM : *Ischemic preconditioning : from mechanisms to exploitation. Cardiovasc Res* 26 : 734-739, 1992
- 14) Shizukuda Y, Mallet RT, Lee SC, Downey HF : *Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. Cardiovasc Res* 26 : 534-542, 1992
- 15) Stephen A, James MD, Charles EG : *Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes : induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. Cardiovascular Research* 28 : 72-77, 1994
- 16) Van Winkle DM, Thornton JD, Downey DM, Downey JM : *The natural history of preconditioning : Cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. Coronary Artery Dis* 2 : 613-619, 1991
- 17) Berne RM : *The role of adenosine in the regulation*



- of coronary blood flow. *Circ Res* 47(6) : 807-813, 1980
- 18) Cronstein BN, Kramer SB, Weissman G, Hischorn R : Adenosine : A physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 153 : 1160-1167, 1983
  - 19) Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissman G, Hischorn R : Adenosine : An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 78 : 760-770, 1986
  - 20) Zhenhai Y, Garrett JG : A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* 89 : 1229-1236, 1994
  - 21) Gurden MF, Coates J, Ellis F : Functional characterization of three adenosine receptor subtypes. *J Pharmacol* 109 : 693-698, 1993
  - 22) Wilken A, Tawfik-Schlieper H, Schwabe U : Evidence against the presence of A2 adenosine receptors on guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 192 : 161-163, 1991
  - 23) Linden J : Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB J* 5 : 1668-2676, 1991
  - 24) Tucker AL, Linden J : Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovasc Res* 27 : 62-67, 1993
  - 25) Nishizuka Y : Studies and perspectives of protein kinase C. *Science Wash DC* 233 : 305-312, 1986
  - 26) Ganong BR, Loomis CR, Hannun YA, Bell RM : Specificity and mechanism of protein kinase C activation by n-1,2-diacylglycerols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 1184-1188, 1986
  - 27) Birnbaumer L : G proteins in signal transduction. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30 : 675-705, 1990
  - 28) Garcia-Sainz J : Cell responsiveness and protein kinase C : receptors, G proteins, and membrane effectors. *News Physiol Sci* 6 : 169-173, 1991
  - 29) Kubalak SW, Neuman WH, Webb JG : Differential effect of pertussis toxin on adenosine and muscarinic inhibition of cyclic AMP accumulation in canine ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 23 : 199-205, 1991
  - 30) Cohen MV, Downey JM : Ischemic preconditioning : can the protection be bottled? *Lancet* 342 : 6, 1993
  - 31) Kitakaze M, Hori M, Kamada T : Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovasc Res* 27 : 18-27, 1993
  - 32) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Inoue M, Kamada T : Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5' nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs : implications for myocardial salvage. *Circulation* 87 : 208-215, 1993
  - 33) Habushi Y, Tanaka H, Furukawa T, Tsujimura Y, Yoshimura M : Endothelin enhances delayed potassium current via phospholipase C in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 262 : H345-H354, 1992
  - 34) Tohse N, Kameyama M, Irisawa H : Intracellular  $Ca^{2+}$  and protein kinase C modulate  $K^{+}$  current in guinea pig heart cells. *Am J Physiol* 253 : H1321-H1324, 1987
  - 35) Tohse N, Nakaya H, Kanno M : Alpha-adrenoreceptor stimulation enhances the delayed rectifier  $K^{+}$  current of guinea pig through the activation of protein kinase C. *Circ Res* 71 : 1441-1446, 1992
  - 36) Pieper GM, Gross GJ : Protective effects of nicorandil on postischemic function and tissue adenine nucleotides following a brief period of low-flow global ischemia in the isolated rat heart. *Pharmacology* 38 : 205-213, 1989
  - 37) Grover GJ, McCullough JR, Henry DE, Conder ML, Selph PG : Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and chromakalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther* 251 : 98-104, 1989
  - 38) Auchampach JA, Gross GJ : Myocardial preconditioning is mediated by activation of the ATP regulated potassium channel(abstract). *FASEB J* 5 : A1103, 1991
  - 39) Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM : Protein kinase C : Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 75 : 586-590, 1994
  - 40) Thornton JD, Daly JF, Cohen MV, Downey JM : Catecholamines induce adenosine receptor-mediated protection of the myocardium but do not participate in ischemic preconditioning in the rabbit. *Circ Res* 73 : 649-655, 1993
  - 41) Przyklenk K, Kloner RA : The protein kinase C inhibitor H7 fails to attenuate the cardioprotective effects of ischemic preconditioning in the canine model

- (Abstract). *FASEB J* 8 : A118, 1994
- 42) Casnellie J : *Protein kinase inhibitors : probes for the functions of protein phosphorylation/ Adv. Pharmacol* 22 : 167-205, 1991
- 43) Tamaoki T : *Use and specificity of staurosporine; UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. Methods Enzymol* 201 : 340-476, 1991