허혈성 전처치(Ischemic Preconditioning)의 심장보호 효과에 관한 연구 : Adenosine과 Protein Kinase C의 역할*

중앙대학교 의과대학 조직학교실, 한라병원 내과**
김 현 · 김대중 · 김성수** · 라봉진 · 김호덕

= Abstract =

The Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning : Role of Adenosine and Protein Kinase C

Hyun Kim, M.S., Dae-Joong Kim, M.D., Sung-Soo Kim, M.D.,**
Bong-Jin Rah, M.D., Ho-Dirk Kim, M.D.

Department of Histology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea
*Department of Internal Medicine,** Halla General Hospital, Cheju, Korea*

Background : Brief episodes of coronary blood flow interruption, ischemic preconditioning (IP), following a prolonged ischemia induces myocardial tolerance to ischemia and improves myocardial function during reperfusion by undefined mechanism. Recently, it has been suggested that the signal transduction pathway of the cardiomyocyte itself may involve in this protection. The aims of the present study were : (1) to examine the effect of adenosine in early phase of IP, (2) to define the relationship between the adenosine and protein kinase C (PKC).

Methods and Results : Hearts isolated from New Zealand White rabbit (1.2 -1.5kg body weight, n=78) were perfused with Tyrode solution by non-recirculating Langendorff technique. After stabilization of baseline hemodynamics, the hearts were subjected to receiving 45min global ischemia (I) and 120min reperfusion (R) with or without IP. IP was induced by a single dose of 5min I and 10min R. A part of the IP hearts, calphostin C (200nmol/L), a PKC inhibitor, was administered 5min before IP and sustained during IP regimen. Left ventricular function and coronary flow were monitored. Infarct size was determined by staining with 1% triphenyltetrazolium chloride solution and computerized planimetry. Adenosine concentration in the coronary flow was determined by HPLC. Myocardial cytosolic and membrane PKC activities were measured by ^{32}P - γ-ATP incorporation into PKC specific peptide. Expression of PKC- e and PKC- d was determined by SDS-PAG - ε and Western blot.

IP enhanced improvement of functional recovery ($p<0.05$, in the left ventricular developed and end-

*본 연구의 일부는 1996년 교육부 학술연구 조성비 (기초의학:259)에 의하여 이루어 짐.

diastolic pressure ; $p<0.01$, in the coronary flow) during 120min R after 45min I. Pre-conditioned hearts showed reduction in the infarct size compared with the non-preconditioned hearts ($p<0.05$) ; however, IP-induced protection was lost by calphostin C. Adenosine release from the cardiomyocytes abruptly increased to 10-20 folds baseline just after IP manipulation and decreased rapidly on reperfusion. Cytosolic PKC activity significantly decreased in the preconidtioned hearts which received 45min I ($p<0.05$) and 45min I and 120min R ($p<0.01$), while the membrane fraction increased in the former ($p<0.05$) and the latter ($p<0.01$) groups. There was no significant difference in the PKC- d activity among all experimental groups in cytosolic and membrane fraction, however, the membrane PKC- e isoenzyme activity was increased in the preconditioned hearts which received 45min I.

Conclusion : These results indicate that (1) a single dose of brief ischemia has an infarct-limiting effect and can improve post-ischemic contractile dysfunction after 45min subsequent sustained I ; and (2) increase of adenosine release in the earlier period of IP regimen and translocation of PKC from the cytosol to myocyte membrane may be important processes signal transduction for protection. These results suggest that cardioprotective mechanism responsible for IP in isolated rabbit heart may be initiated by adenosine and PKC.

KEY WORDS : Ischemic preconditioning · Adenosine · Protein kinase C · Calphostin C.

서 론

1986년 Murry 등[1]은 잡종개의 심장을 이용한 실험에서, 5분 이내의 허혈을 일으킨 후 재관류를 시행한 심장에서 후속되는 보다 긴 기간동안의 허혈에 대하여 괴사 범위가 한정되는 등의 저항성이 있음을 관찰하였다. 즉 짧은 기간동안의 반복된 허혈이 역설적으로 허혈에 대한 심근 보호효과를 나타냄을 관찰하고 " 허혈성 전처치(ischemic preconditioning ; 이하 IP) " 라고 명명하였다. IP에 의한 심근보호 효과는 인위적인 처치없이 심근에 내재되어 있을 것으로 믿어지는 자연적인 자기 보호기전의 발현에 의하여 허혈 손상에 대항한다는 점에 그 중요성이 있다. 이와 같은 IP의 심근보호 효과는 잡종개를 비롯하여 흰쥐, 돼지, 토끼 등의 다양한 실험동물에서 관찰되고 있으며[2-10] 사람의 심장에서도 관상동맥 성형술을 받은 환자에서 최초 시술때 보다 후속 되는 두번째, 세번째 처치에서 환자가 느끼는 통증이 경감된다고 알려져 있고, 실제로 EKG 상에서 ST-절(segment)의 상승이 억제되는 등 IP 효과로 생각되는 보호효과가 보고되고 있다[11,12]. 따라서 IP에 의한 심근보호 효과의 세포병리학적인 기전이 밝혀져 사람에게 적용된다면 허혈로 인한 심근 손상의 예방 및 치료, 나아가서는 개심술 등의 치료과정에서 따르는 손상을 감소시킬 수 있는 방법을 개발할 수 있다는 점에서 그 중요성이 매우 크다고 볼 수 있다.

최근 허혈성 질환에 대한 관심이 높아지고 있는 현실에서 이와 같은 IP의 심근보호 효과의 기전을 세포내부에 자연적으로 존재하는 신호전달체계를 통한 "세포의 허혈에 대한 대항 " 이라는 구체적인 가설이 제시되고 있다. 이 가설은 자극의 수용체 부분, 전달체 그리고 최종작용체의 세 부분으로 나뉘어 연구되고 있는데, 수용체 부분에서는 adenosine A1 수용체[13], 무스카린성 수용체[14], α_1-아드레날린성 수용체[15] 등이 연구되고 있고, 세포막 과 세포질 사이에서 작용하는 제2전달체(second messenger)로는 protein kinase C(이하 PKC)가 광범위하게 연구되고 있다[16,17].

이상으로 저자들은 허혈 및 IP를 실시한 심장에서 유리되는 adenosine의 양을 측정하여 adenosine 수용체의 작용 및 작용시점을 간접적으로 관찰하고, 심근조직내의 PKC 활성도 및 PKC 동종효소(isozyme PKC-ε , -δ)의 조성 변화를 추적하여 두 기전 사이의 연관관계를 고찰하고자 하였다. 또한 PKC 활성차단제인 calphostin C를 투여하여 PKC 활성과 IP의 심근보호 효과와의 관계를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

복합사료와 물을 제한없이 주어 사육한 체중 1.2 1.5kg의 건강한 흰토끼(New Zealand White rabbit)를 실험동물로 사용하였으며, 동물실험은 미국생리학회가 추천하는 실험동물 사용지침(Guidelines for the Use of Laboratory Animals, American Physiology Society, 1985)에 따라 실시하였다. Heparin(300 IU/kg)을 복강내 투여하고 30분 경과후 후두부를 강타하여 실신시키고 즉시 흉부를 절개하여 심장을 적출하였다. 심장을 미리 냉각시켜둔 생리식염수에 담근 후 대동맥에 카뉼라(외경 2.5mm, 내경 2.0mm)를 삽관하고 4 - 0 견봉합사로 묶은 후 관류장치(Size 5, Hugo Sachs Electronik, March - Hugstetten, Germany)에 고정하여 non - recirculating Langendorff 방법에 따라 100% 산소로 포화된 Tyrode 용액(containing in mM : NaCl 140.0, KCl 4.4, $CaCl_2$ 1.0, $MgCl_2$ 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0 ; pH 7.4)으로 관류하였다. 실험중 심장을 매다는 방(water - jacketed heat chamber)의 온도는 37℃로, 관류압과 관류량은 60mmHg 및 35ml/min으로 각각 유지하였고, 흡인판이 부착된 전극을 우심방 외벽에 2 3mm 간격으로 부착하여 이에 연결된 전기자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Eden - bridge, UK)로 1분당 심박동수가 150회가 되도록 조정하였으며(4.0 V, 0.5 msec interval), Tyrode 용액으로 50분간 관류하여 심장기능이 일정하게 유지되도록 한 후 이를 모든 실험의 기준점으로 하였다.

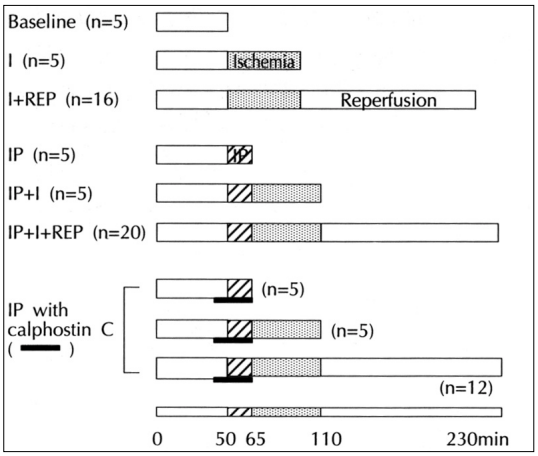

Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. I, 45min ischemia ; IP, preconditioned ; REP, 120min reperfusion.

2. 실험 protocol

실험 protocol은 Fig. 1과 같다.

정상대조군은 관류후 심장기능이 일정하게 유지되도록 한 후 이를 모든 실험의 기준점으로 하였다. 50분동안 관류하여 일정한 상태를 얻은 후 45분동안 관류를 중지하여 허혈을 유도하였고, 허혈 후 120분동안 재관류하였다. IP는 5분 허혈, 10분 재관류를 1회 시행하여 유도하였다.

PKC 활성억제제인 calphostin C는 IP 조작 5분 전부터 IP 종료시점까지 관류액 중에 일정한 농도를 유지하면서 투여하였다. Calphostin C는 DMSO(di - methyl sulfoxide)에 용해시켜 관류액으로 희석하여 사용하였으며 calphostin C의 최종 농도는 200nmol이 되도록 하였다. Calphostin C의 농도 및 약제의 처리는 Armstrong 등[18]의 연구결과를 기준으로 하였다.

3. 좌심실 기능 및 관혈류(coronary flow)의 측정

Tyrode 용액으로 50분동안 관류하여 일정한 상태가 유지되면 폐정맥을 통하여 좌심실에 만곡형 카뉼라에 연결된 내용적 0.7ml의 latex balloon(size 10, Hugo Sachs Elektronik, Germany)을 삽입하고 압력전달 장치(Statham Transducer P23Db, Hugo Sachs Elektronik, Germany)에 연결하였다. 나사식 미세조정 주사기를 이용하여 latex balloon에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end - diastolic pressure, LVEDP)이 8 10mmHg가 되도록 조정한 후 좌심실내압(left ventricular developed pressure, LVDP), 심근수축력(+dP/dt) 등을 기록하였다(WR9000, Watanabe - Graphtech, Japan). 관류를 시작하여 심장기능이 일정하게 유지되면 관혈류(coronary flow)를 측정하기 위하여 폐정맥과 대정맥을 견봉합사로 결찰한 후 폐동맥을 통하여 우심실내로 카뉼라를 삽관하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하였다.

4. 좌심실의 괴사크기 측정

각 실험 종료후 심장을 관류장치로부터 분리하여 실온에서 1% triphenyltetrazolium chloride 용액(TTC, in phosphate buffer, pH 7.4)으로 20분동안 관류 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정된 심장을 심저부와 평행한 방향으로 2 3mm 간격으로 횡절단한 후 심저부를 향하는 횡단면을 Kodak Ektachrome 필름(ISO 100)으로 사진 촬영하여 괴사부위 측정에 사용하였다. 환등필름을 영사막에 투사하고 심실중격을 포함하는 좌심실 횡단면(LV cross sectional area, LVA)과 괴사부위의 단면(infarcted area, IA)을 추적하여 투사지 위에 복사한 후 구적계(computerized areacurvimeter, X-Plan 360d II, Ushikata, Tokyo, Japan)를 이용하여 괴사부위의 밀도(% IA/LVA)를 구하고 이를 괴사크기로 하였다.

5. 관혈류중의 유리 adenosine 정량

관혈류중 유리 adenosine의 양을 측정하기 위하여 기준점, IP 직후, 허혈-재관류 0, 5, 10, 30, 60분에 관혈류를 1분동안 모은 후 즉시 1.0ml를 취하여 0.1 ml의 perchloric acid(16.4% w/w)를 첨가하여 원심분리하였다. 상청액 1.0ml에 30 μl의 NaOH를 첨가하여 중화시킨 후 원심분리하여 상청액 20 μl를 취하여 Gilson 305 HPLC(high performance liquid chromatography) system을 사용하여 adenosine의 양을 측정하였다.

6. PKC 활성도의 측정 및 동종효소의 검색

좌심실 조직을 완충용액(containing in mM ; Tris-HCl 20.0, sucrose 250.0, IAA PMSF 1.0, EDTA 1.0, EGTA 1.0, β-mercaptoethanol 10.0, pH 7.4 at 4℃)과 함께 homogenizer(Ultra-Turrax T-25,

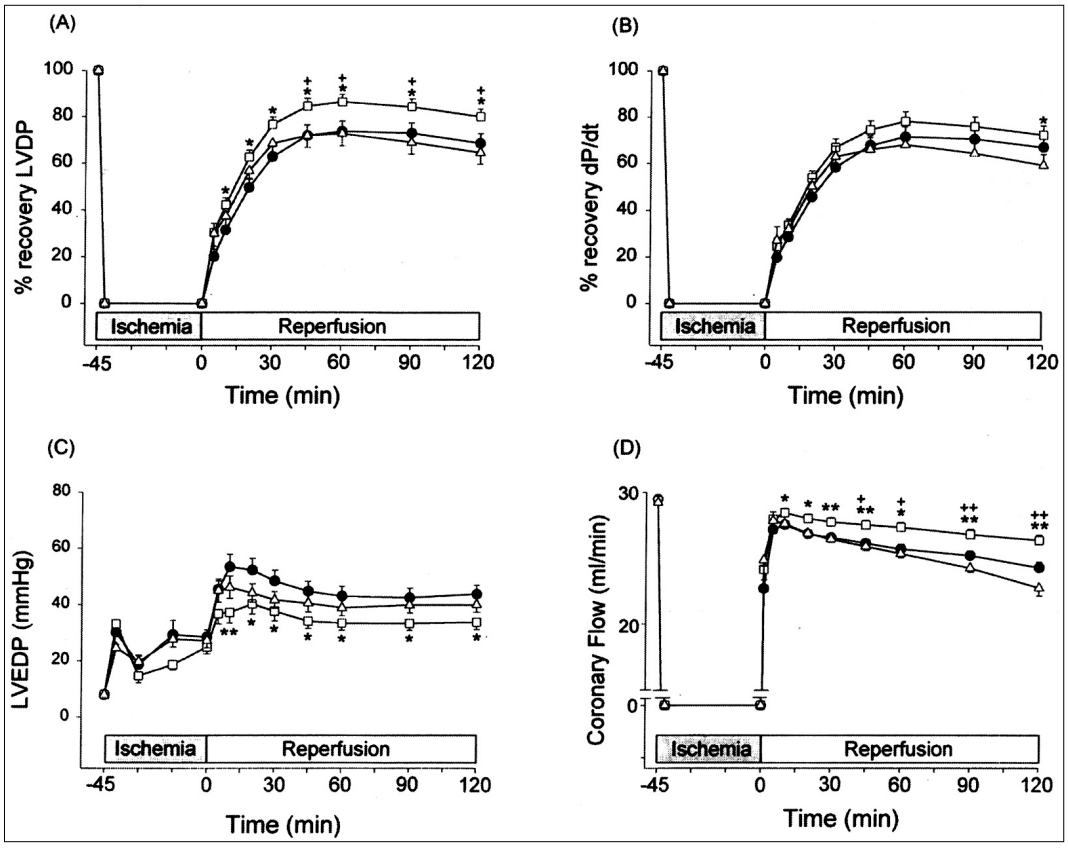

Fig. 2. Changes in the % recovery left ventricular develped pressure(LVDP, A), % recovery +dP/dt(B), left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP, C), and the coronary flow(D). Data are expressed as mean± SEM. Symbols : ●, ischemic control(n=16) ; □, IP+I+REP(n=20) ; △, IP(Cal)+I+REP(n=12). *p<0.05 and **p<0.01, ischemic control vs. IP+I+REP ; +p 0.05 and ++p 0.01, IP+I+REP vs. IP(Cal)+I+REP.

Janke & Kunkel, Germany)로 균질화한 후(6×30초, 10,000rpm) 100,000g 에서 1시간 동안 원심분리하여 그 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다. 침전물을 다시 위와 같은 완충용액에 Triton X-100 (0.3%)을 첨가한 용액으로 녹여 4℃에서 1시간 동안 방치(stirring)한 후 100,000g 에서 1시간 동안 원심분리하여 그 상청액을 막 분획으로 사용하였다. PKC 활성도는 protein kinase C assay system (Amersham code RPN 77)을 이용하여 측정하였다.[19]

좌심실에서 추출한 시료 단백질(50 μg)로부터 PKC-δ,ε에 대한 western blotting을 실시하여 ECL TM (enhanced chemiluminescence, Amersham, UK) kit를 이용하여 검색하였다.

9. 약물의 준비 및 통계처리

본 실험에서 사용된 시약은 calphostin C(Research Biochemicals International, U.S.A)를 제외하고는 모두 Sigma Chemical Company(St. Louis, Mo, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였다. SAS 통계 시스템(Window version 6.11, 1988)을 이용하여 분산분석을 실시하였으며 *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실 험 결 과

1. 좌심실의 기능적 척도들의 변화

좌심실내압은 각 군에서 공히 재관류후 45분까지 급격히 증가하는 양상을 보이고, 이후 다소 감소하는 양상이었으나 비교적 일정한 상태를 유지하였다. 허혈대조군에 비하여 IP군에서 재관류 10분 후부터 전 구간에 걸쳐 뚜렷한 회복을 관찰하였으나($p<0.05$, Fig. 2A), calphostin C를 투여한 군에서는 IP에도 불구하고 IP 군에 비하여 현저히 낮은 회복율을 나타내었다($p<0.05$, Fig. 2A). +dP/dt의 회복율은 허혈대조군과 IP 군 사이에 차이가 없었으나 calphostin C를 투여한 군에서는 IP 군에 비하여 재관류후 120분에 차이를 나타내었다($p<0.05$, Fig. 2B).

LVEDP는 허혈후 증가한 것을 관찰할 수 있었으나 IP 군에서는 재관류 10분 이후에 LVEDP의 두드러진 감소가 관찰되었다($p<0.05$, Fig. 2C). 그러나 calphostin C 투여군에서는 IP에도 불구하고 허혈대조군과 차이가 없었다.

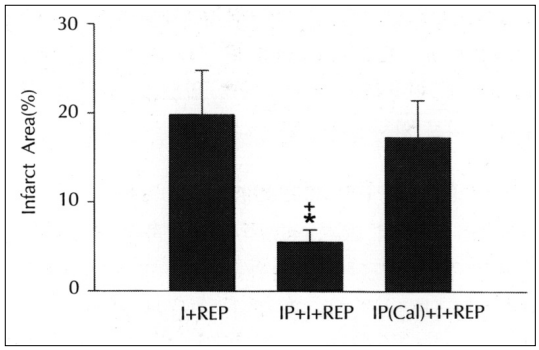

Fig. 3. Infarct size as % of left ventricular volume. Data are expressed as mean±SEM : *p<0.05, IP+I+REP vs. I+REP ; +p<0.01, IP+I+REP vs. IP(Cal)+I+REP.

2. 관혈류(coronary flow, CF)의 변화

기준점의 관혈류 양은 29.4±0.07ml/min이었다. 허혈대조군에 비하여 IP군에서 재관류 20분 이후에 관혈류의 유의한 증가가 관찰되었으며($p<0.05$) 특히 45분 이후부터 현저한 증가가 관찰되었다($p<0.01$, Fig. 2D). Calphostin C 투여군은 재관류 45분 이후에 IP군에 비하여 감소하였으며($p<0.05$) 특히 재관류 90분 이후에 현저한 감소를 관찰하였다($p<0.01$, Fig. 2D).

3. 심근괴사 범위

심근괴사 범위는 허혈대조군(I+REP ; 19.9±0.05%)과 비교하여 IP+I+REP 군(5.5±1.39%)에서 유의하게 감소하였다($p<0.05$, Fig. 3). 그러나 calphostin C 투여군에서는 17.3±4.17%로 IP+I+REP 군에서 관찰되었던 IP에 의한 괴사감소 효과가 완전히 소실된 것을 알 수 있었다($p<0.05$, Fig. 3).

4. 관혈류중 유리 adenosine 농도의 변화

기준점, IP 직후, 재관류후 0, 5, 10, 30, 60분에 관혈류(coronary flow)를 각각 채취하여 유리 adenosine의 농도를 측정하였다. 기준선에서의 I+REP, IP+I+REP, IP(Cal)+I+REP군의 adenosine 농도는 0.11±0.035, 0.15±0.049, 0.08±0.010nM이었다. IP 직후 adenosine은 1.54±0.301(IP+I+REP군), 1.00±0.249 nM(IP(CAL)+I+REP군)로 기준선에 비하여 약 10 20배로 급격히 증가하였다(Fig. 4). 재관류가 진행되면서 I+REP군 및 IP+I+REP군에서 adeno-

sine은 급격히 감소하는 양상을 보였다. IP (Cal)+I+REP 군에서는 허혈대조군 및 IP군에 비하여 특이한 차이가 나타나지 않았다.

5. PKC 활성도의 변화

기준선의 세포질 분획 및 막 분획의 PKC 활성도는 각각 1456.1±60.90, 271.9±28.81pmol/mgprotein/min이었다. I군 및 I+REP군에서는 세포질 및 막 분획에서 활성도의 차이는 없었다. IP 직후(IP군)에는 두 분획에서 공히 활성도의 변화를 볼 수 없었으나 IP 후 45분 동안 허혈 및 재관류를 실시한 군(IP+I군, IP+I+REP군)에서 세포질 분획의 활성도 감소를 관찰하였다($p<0.05$, Fig. 5A). 반면 막분획의 활성도는 250.1±17.76(IP), 391.5±55.56(IP+I, $p<0.05$, Fig. 5B), 433.5±26.20pmol/mg protein/min(IP+I+REP, $p<0.01$, Fig. 5B)로 허혈 및 재관류를 실시함에 따라 활성도의 유의한 증가를 관찰하였다(Fig. 5B). PKC 활성 억제제인 calphostin C를 투여한 실험군에서는 모든 군에서 PKC 활성의 억제가 관찰되었다.

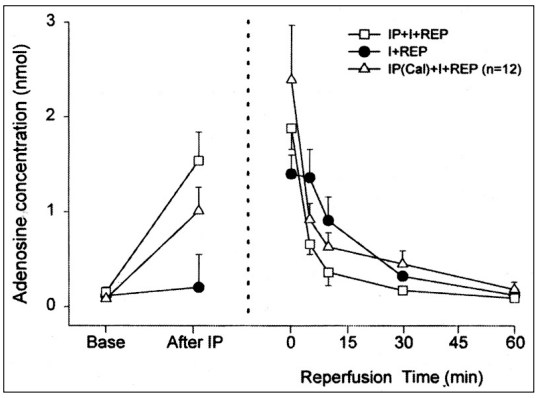

Fig. 4. Changes in the adenosine release. Data are expressed as mean±SEM. Adenosine release increases 10- to 20-fold after ischemic preconditioning(IP)irrele-vant to calphostin C administration.

6. PKC-δ 및 -ε 의 변화

IP의 심장보호효과에 영향을 미치는 것으로 알려진 PKC의 동종효소인 PKC-δ[20] 및 PKC-ε[21]의 세포질 분획과 막분획에서의 활성의 변화를 단클론항체를 사용하여 비교하였다. 그러나 PKC-δ는 허혈대조군 및 IP군에서 막분획 또는 세포질 분획의 활성의 변

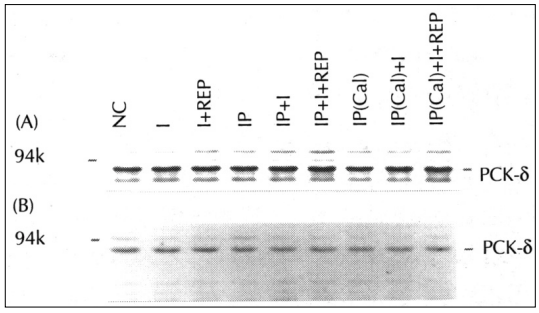

Fig. 6. Western blot analysis of the PKC-δ. Cytosol(A) and membrane fractions(B). NC, normal control ; I, 45min ischemia ; I+REP, ischemia followed by 120min reperfusion ; IP, preconditioned ; IP (Cal), calphostin C-treated preconditioned.

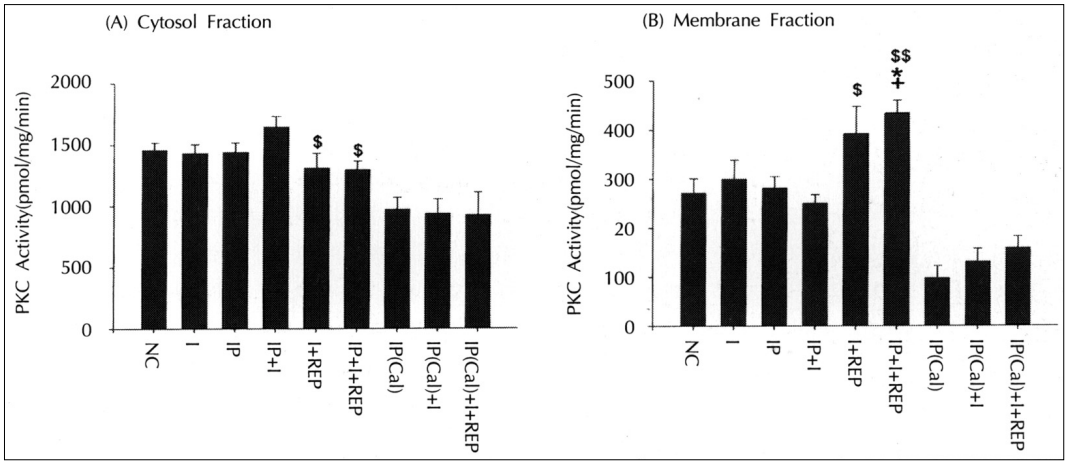

Fig. 5. Changes in the activity of protein kinase C(PKC) both in the cytosol(A) and myocyte membrane(B) fraction in experimental groups(n=5 each). Data are expressed as mean±SEM. NC, normal control ; I, 45min ischemia ; IP, preconditioned ; REP, 120min reperfusion. $^{\$}p<0.05$, IP vs. IP+I ; $^{\$\$}p<0.01$, IP vs. IP+I+REP ; $^{*}p<0.01$, NC vs. IP+I+REP ; $^{+}p<0.05$, I+REP vs. IP+I+REP.

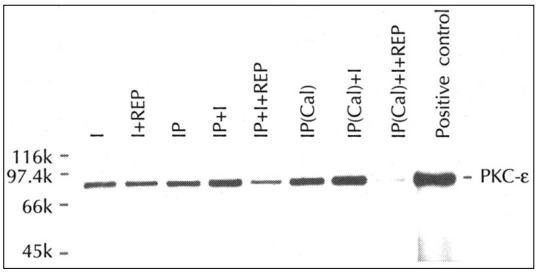

Fig. 7. Western blot analysis of the PKC-ε in the membrane fraction. NC, normal control ; I, 45min ischemia ; I+REP, ischemia followed by 120min reperfusion ; IP, preconditioned ; IP(Cal), calphostin C-treated preconditioned.

화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6A, B).

PKC-ε의 세포질 분획 활성도 변화는 관찰되지 않았으며, 막분획의 활성도는 허혈대조군에서 단순 허혈을 실시한 실험군(I)과 재관류를 시행한 실험군(I+REP) 사이에 특이한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 7). IP를 시행한 실험군 중에서 IP군은 정상대조군에 비하여 차이를 볼 수 없었으나 IP 후 45분동안 허혈을 실시한 실험군(IP+I)에서는 활성도의 현저한 증가가 관찰되었다(Fig. 7). 그러나 이후 재관류를 실시한 실험군(IP+I+REP)에서는 다시 허혈 실시 이전 수준의 낮은 활성도를 나타내었다. IP를 실시한 실험군에서 나타나는 이와 같은 결과는 PKC 억제제를 사용한 IP(Cal), IP(Cal)+I, IP(Cal)+I+REP군에서도 같은 경향을 나타내었다.

고 안

본 실험 결과 5분 허혈, 10분 재관류로 이루어진 1회의 IP로 후속되는 45분동안의 허혈에 대하여 괴사범위의 감소가 관찰되었을 뿐만아니라 재관류 초기 좌심실 기능의 회복 정도가 증진되는 등 뚜렷한 심근보호 효과를 관찰할 수 있었다.

1. IP 심근보호 효과와 adenosine

IP의 기전에 대하여 현재 많은 가설들이 제시되고 있으나 IP의 심근보호 효과를 특정한 한 분야의 기전으로 설명하기에는 곤란한 점이 많다. 최근에 IP 효과를 자극에 대한 세포의 체계적인 대항 또는 적응이라는 차원에서 이해하려는 시도와 함께 세포의 신호전달체계에대한 관심이 높아가고 있다. 이 가설은 최초의 허혈로 발생하는 자극은 세포막에 존재하는 수용체를 통해 세포 내부로 전달되어 세포내에 존재하는 작용체 또는 또다른 방어기전의 활성을 통하여 주어진 자극에 대항한다는 점이 핵심이 되며, IP의 심근보호 효과는 짧은 기간동안의 허혈과 재관류로 이루어진 IP에 의해 미리 활성화된 방어기전이 후속되는 장기간의 허혈 상황에 대처하는 과정이라고 해석하고 있다.

자극을 세포내로 전달하는 수용체로는 본 실험에서 다룬 adenosine 수용체[13] 이외에도 무스카린성 수용체[14], α_1-아드레날린성 수용체[15] 등이 알려져 있으나 최근 adenosine A_1 수용체가 주목을 받고 있으며, 따라서 그 매개물질인 adenosine의 생체내 작용, 특히 허혈 심근내에서의 대사 및 약리작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Kitakaze 등[22]은 IP에 뒤이은 허혈-재관류 실험에서 심근세포로부터 유리되는 adenosine의 양이 증가함을 보고한 바 있고, Miura 등[23], Yao와 Gross[24]는 adenosine을 투여한 잡종개의 심장에서 IP의 심근보호 효과와 유사한 결과를 얻었음을 보고하였다. 본 실험에서 유리 adenosine 양이 IP 직후에 기준점에 비하여 급격히 상승한 것은 심근세포는 IP를 가할 당시에 이미 상당량의 adenosine에 대해 폭로되었음을 나타내는 결과라 할 수 있으며, adenosine 수용체 차단제인 8-sulfophenyltheophylline을 투여한 토끼의 심장에서 IP의 심근보호 효과가 사라진 사실[13]은 adenosine이 심근보호 효과의 주요한 부분을 차지하는 것을 반증하는 것이라 할 수 있다.

본 실험에서 IP 직후 급격히 증가하였던 adenosine은 재관류가 진행됨에 따라 급속히 감소하는데 이런 결과는 adenosine의 반감기가 매우 짧다는 사실을 고려할 때 adenosine은 IP 초기의 비교적 짧은 기간동안 작용하고 재관류 시기에는 그 역할이 미미할 것임을 시사하는 것이다. 따라서 adenosine 수용체의 역할에 대한 보고들과 본 실험의 결과를 종합할 때 토끼 심장에서 adenosine은 초기에 심근보호 효과를 일으키는 물질로 판단되며 직접 보호효과를 나타낸다기보다는 기폭제(initiator)로서의 역할을 행하는 것으로 추측된다.

2. IP 심근보호 효과와 protein kinase C

PKC는 현재까지 9~10개의 동종효소(isozyme)로 구성되어 있는 것으로 알려져 있으며, 세포 외부의 신

호를 감지하고 이를 세포 내부로 전달하도록 하는 제 2 매개체(second messenger)로서 세포막과 세포질 사이에 위치하며, 자극 수용체와 최종 작용체(end-effector) 사이를 연결하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PKC는 세포내 단백질중 serine/threonine기를 인산화(phosphorylation)시킴으로써 심근의 경우 칼슘을 비롯한 이온 농도의 조절, 심장의 박동 및 수축력 조절, 유전자 발현, cardiac factor의 생산, 심근세포비대(hypertrophy) 등의 다양한 생물학적 반응들을 조절하는 것으로 알려져 있다.

Ytrehus 등[17]은 PKC 활성차단제인 staurosporine을 투여한 토끼 심장에서 IP에 의한 괴사범위 감소효과가 완전히 소실되는 것을 관찰하였고, 이와 유사한 결과는 토끼를 비롯하여 돼지, 잡종개, 흰쥐 등 여러 실험동물에서 관찰된 바 있다. 그러나 대부분의 연구자들은 기능촉진제(agonist) 또는 길항제(antagonist) 등을 이용하여 PKC 활성을 억제하거나 또는 증진시킴으로써 IP 효과에 미치는 영향을 간접 평가하였고[17,25] 정량분석을 통하여 IP에 의해 PKC 활성도에 어떤 변화가 나타나는가에 대한 연구는 미진한 실정이다. 물론 PKC가 많은 동종효소로 구성되어 있다는 점, 그리고 허혈 심근손상 기전에 매우 중요한 역할을 하는 Ca^{2+}의 영향[26,27]을 고려하기 힘들다는 점에서 PKC 변화에 대한 정량분석적 접근이 관심을 끌지 못하였던 것으로 추측되나 본 연구에서는 총 PKC의 활성도 변화를 관찰하고 각각의 PKC 동종효소, 또 Ca^{2+} 의존성 또는 비의존성 PKC 동종효소의 변화를 살핀다면 IP 효과에 미치는 PKC의 영향을 고찰할 수 있을 것으로 생각하였다.

정상 심근세포내에서 PKC는 막성분인 phospholipid의 대사물질인 diacylglycerol에 의해 성화되며 활성화된 PKC는 세포질로부터 세포내의 특정 부위[28,29] 또는 여러 가지 막성분으로 전이(translocation)되어 활성화되므로[30] IP의 심근보호 효과 또한 PKC가 막성분으로 전이됨으로써 발생할 것으로 생각되고 있다[31]. 본 실험의 IP군에서 막 분획의 PKC 활성도는 IP 후 45분간의 허혈 및 재관류를 실시한 심장에서 점차 증가하는 추세인데 비하여 세포질 분획의 활성도는 그와는 대조적으로 점차 감소하는 결과를 보인 것은 막분획으로의 전이를 입증하는 결과로 해석할 수 있다. IP후 허혈 및 재관류를 거치면서 막분획의 PKC 활성도가 계속 증가한 상태를 유지하고 있는 것은 세포질로부터의 전이가 계속 진행되고 있거나 또는 PKC를 활성화시키는 자극이 지속되고 있음을 의미하므로 PKC를 매개로 하는 일련의 반응이 계속 일어나고 있음을 반증하는 결과라 할 수 있다.

Strasser 등[32]은 짧은 기간동안의 허혈에 의하여 PKC는 세포질로부터 세포막으로 이동한다고 하였으며, 이러한 PKC의 이동은 미세관을 통하여 일어난다고 하였다[31]. Mitchell 등[20]은 적출관류 흰쥐 심장에서 짧은 기간의 허혈 및 α-아드레날린성 수용체 활성에 의해 PKC 동종효소중 PKC-δ가 세포막으로 이동한다고 하였으나, 본 연구에서 이용한 토끼 심장에서는 PKC-δ의 이동을 관찰할 수 없었다. 이는 아마도 종간의 PKC 동종효소의 차이에 기인하는 것으로 추측된다. 또 본 실험에서는 PKC-ε에 대한 세포질 분획과 세포막 분획의 조성 변화를 단클론항체를 이용하여 관찰하였다. PKC-ε은 PKC-β와 함께 성숙한 심근세포에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고[21,33], Armstrong과 Ganote[34]는 PKC-ε에 특이적으로 작용하는 활성제인 ingenol을 투여하였을 때 IP 효과와 유사한 결과를 얻음으로써 PKC-ε이 토끼 심근세포에서 IP에 의한 보호효과에 관여할 것이라고 추측하였다. 본 실험 결과 막분획의 효소는 IP와 45분간의 허혈을 거친 심장에서 가장 강하게 발현되었으나 단순히 허혈을 시행한 심장에서는 관찰되지 않았다. 그러나 강하게 나타났던 PKC-ε은 재관류직후 다시 처음 수준으로 감소되었는데 막분획에서는 이와 같은 변화가 관찰된 반면 세포질 분획에서는 발현을 거의 관찰하지 못할 정도로 낮은 수준을 유지하였다.

이와 같은 결과를 종합할 때 PKC 활성억제제인 calphostin C를 투여한 심장에서 보호효과가 소실된 점으로 IP 효과에서 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 판단되고, IP 및 허혈을 실시한 심장에서 막분획 및 세포질분획의 PKC 활성도 증감으로 미루어 PKC의 전이가 보호효과를 일으키는 여러 단계에서 중요한 요소임이 확인되었다. 또 IP 직후보다 허혈을 실시한 이후에 막분획의 활성도가 증가하는 점으로 미루어 심근보호를 수행하는 주 역할은 허혈시기에 일어날 것이라고 추측할 수 있다. PKC의 전이 및 허혈 시기에 보호효과가 일어날 것이라는 사실은 PKC-ε에 대한 immunoblotting에 의해서도 확인되었다. PKC-δ는 특이한 역할을 하지 않는 것으로 판단된다. 그러나 세

포질 분획의 PKC-ε활성이 미미한 점, 또 PKC 활성 억제제인 calphostin C를 사용하였음에도 불구하고 PKC-ε의 활성은 영향을 받지 않는 점은 PKC의 전이와 활성이라는 관계에 의문을 제기하게 된다. 따라서 이러한 의문점을 밝히기 위한 실험들이 앞으로 수행되어야할 것이다.

3. IP의 심근보호 효과에서 adenosine과 PKC의 관계

Adenosine의 역할은 많은 연구자들에 의해 증명된 상태이나 adenosine은 반감기가 매우 짧은 것으로 알려져 있고 또 본 실험 결과에서 보는 바와 같이 IP 직후에 급격히 증가하였던 adenosine은 재관류와 동시에 급격히 감소하는 경향을 나타내므로 그 자체로서 어떤 보호작용을 나타낸다기 보다는 소위 " 기폭제 " 또는 " 매개체(mediator) "로서의 역할을 할 것으로 생각된다.

Adenosine 수용체로는 현재까지 A_1, A_2, A_3의 세 종류가 보고되고 있으나 IP의 심근보호효과는 A_1 수용체에의해 일어나는 것으로 알려져 있다[13,35,36]. Adenosine A_1 수용체는 G-prtoein과 연결되어 있고[37,38] G-protein은 phospholipase C를 활성화시킴으로써 phospholipid를 분해, PKC 활성유도물질로 알려진 diacylglycerol을 생합성하는 것으로 알려져 있다[39]. 본 연구를 위한 예비실험에서 IP 후 8-sulfophenyltheophylline을 투여하였을 때 IP에 의한 막분획의 PKC 활성도 증가가 억제되었는데, 이는 adenosine과 PKC 사이의 관계를 간접적으로 증명하는 결과라 할 수 있고, 본 실험에서 calphostin C를 투여한 심장이 IP에도 불구하고 괴사범위의 감소효과가 사라지고 재관류시 좌심실 기능의 회복율 역시 저하된 것으로 미루어 adenosine과 PKC로 연결되는 기전은 허혈에 대항하여 심장을 보호하는 IP의 작용에서 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 판단된다.

4. IP의 심근보호 효과와 최종 작용체로서의 PKC 기질

IP의 심근보호효과를 세포의 신호전달체계를 이용하여 설명하는 과정에서 가장 논란이 되고 있는 부분의 하나가 PKC의 세포내 기질에 대한 것이다. 가설에 의하면 활성화된 PKC는 세포내 특정 단백질을 인산화(phosphorylation) 시킴으로써 이 단백질 또는 단백질군이 보호작용을 수행하는 것으로 추측하고 있으나 생체내에서 PKC의 기질로 작용하는 물질은 매우 다양하다. 현재 IP의 심근보호 효과에 작용할 것으로 추측되는 기질로는 세포골격 구성인자(cytoskeletal component)[40,41], 이온 channel(ATP-dependent potassium channel)[14], anti-oxidant enzyme[42], stress protein[43] 등이 거론되고 있다.

ATP-sensitive potassium channel(KATP channel)은 1983년 Noma[44]에 의해 발견된 이래로, Gross와 Auchampach[45]는 잡종개를 이용한 실험에서 K^+_{ATP} channel 길항제인 glibenclamide를 투여하여 IP 효과가 소실되는 것을 관찰하고 IP의 심근보호 효과에 K^+_{ATP} channel이 관여할 것이라고 보고하였다. 이후 잡종개[24], 돼지[46,47], 등에서 동일한 결과들이 관찰되었으며, Tomai 등[48]은 환자에게 glibenclamide를 투여하고 관상동맥 성형술을 시술하였을 때 환자가 느끼는 통증의 정도와 EKG 변화를 관찰하여 사람의 심장에서도 K^+_{ATP} channel의 심근보호 효과를 기술한 바 있다. 그러나 토끼 심장의 경우, Thornton 등[49]은 glibenclamide 투여군에서 IP의 심근보호 효과에 변화가 없는 것을 관찰하고 K^+_{ATP} channel의 작용에 의문을 나타내는 등으로 논란의 여지가 있으며 K^+_{ATP} channel의 작용기전에 대한 이해 또한 미진한 실정이다. 최근까지 K^+_{ATP} channel의 활성화에 의한 심근보호 기전은 action potential duration(APD)의 감소로 인한 수축력의 저하, 즉 심장기능저하(cardiodepression)효과와 이에 따른 세포내 에너지 pool의 보존이 중요한 기전으로 알려져 왔다. 그러나 최근 APD의 단축작용을 일으키지 않을 정도의 저농도로 bimakalim(K^+_{ATP} channel 길항제)을 투여하였을 때에도 괴사 범위의 감소가 관찰되었고[24], APD 감소를 억제할 수 있는 약물(dofetilide)과 cromakalim(K^+_{ATP} channel agonist)을 동시에 투여해도 심근보호 효과가 유지되었다는 보고[50]로 미루어 단순한 심근기능 저하에 따른 보호 이외에 다른 기전이 존재할 것으로 추측된다.

5. 본 실험의 한계

적출관류 심장을 이용한 실험은 심근의 세포병리학적인 변화를 조속한 시간내에 관찰할 수 있고, 심근세포에서 나타나는 최초의 생화학적인 적응과정을 살필 수 있다는 점에서 유의성이 있으나 반대로 장기적인 변화를 관찰하기에는 시간적인 제약이 따른다. 또한

관류액으로 사용한 용액은 혈액이 아닌 생리적 용액(physiological solution, Tyrode 용액)이 이용되었기 때문에 재관류에 의해 유발되는 심근손상과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려진 백혈구와 같은 혈구 세포와 심근세포 사이에서 나타나는 생물학적 반응들을 관찰할 수 없다. 따라서 임상적인 응용을 위해서는 생체(in vivo)를 이용한 장기간에 걸친 실험이 필수적일 것으로 판단된다.

요 약

연구배경 :

짧은 기간의 허혈-재관류를 반복-허혈성전처치(ischemic preconditioning, IP)-할 경우 후속되는 보다 긴 기간의 허혈에도 불구하고 재관류시 심근의 수축기능이 증가되며 심근괴사 범위가 줄어드는 등의 심근보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 세포의 신호전달 경로를 통해 그 기전을 밝히려는 연구가 주목을 받고 있다. 본 연구에서는 적출 토끼 심장을 이용하여 IP의 심근보호 효과를 일으키는 신호전달 경로의 중요한 단계로 알려진 adenosine의 유리를 관찰하고 세포내 PKC 활성도 변화를 관찰하여 신호전달 경로에서 이들의 작용, IP의 심근보호 효과와의 관계를 알아보고자 하였다.

방 법 :

적출관류 토끼 심장을 이용하여 1) 50분동안 관류하여 일정한 상태를 얻은 후, 2) 45분동안 관류를 중지하여 허혈을 유도하였으며(I군, n=16), 3) 45분 허혈 후 120분동안 재관류하였다(I+REP 군, n=5). 4) IP는 5분 허혈, 10분 재관류를 1회 실시하여 유도하였으며(IP 군, n=5), 5) IP에 이어 45분동안 허혈을 실시하였고(IP+I 군, n=5), 6) IP 및 45분동안의 허혈을 실시한 심장을 120분동안 재관류하였다(IP+I+REP 군, n=20). 7) IP 5분전부터 허혈전까지 PKC 활성억제제(calphostin C ; 200nmol)가 포함된 관류액으로 관류하여 4), 5), 6)군과 동일한 실험을 시행하였다. 허혈후 재관류 기간동안 좌심실 기능을 기록하였고, 관혈류로부터 유리 adenosine의 농도를 측정하였으며, 심근괴사 범위를 결정하기 위하여 1% TTC(triphenylte-trazolium chloride)로 염색하여 형태계측하였다. 각 군의 좌심실 조직으로부터 PKC의 활성도를 측정하였고, PKC-δ및 PKC-ε의 조성변화를 관찰하였다. 모든 측정치는 통계학적으로 검정하였다.

결 과 :

심근괴사 범위는 허혈대조군에 비하여 IP 군에서 뚜렷한 감소를 보였다($p<0.05$), 뿐만 아니라 좌심실내압(LVDP), +dP/dt 및 좌심실 이완기말압(LVEDP) 등 좌심실 기능 역시 IP 군에서 뚜렷한 회복 양상을 보였다. 그러나 calphostin C를 투여한 심장에서는 IP에도 불구하고 허혈군과 비교하여 괴사범위에 차이가 없었으며($p<0.05$), 좌심실 기능 또한 IP 군에 비하여 현저히 낮은 회복율을 나타내었다. 재관류후 관혈류의 변화는 허혈대조군에 비하여 IP 군에서 재관류 60분 이후에 현저한 증가를 보였으나($p<0.01$) calphostin C 투여군에서는 증가 효과를 나타내지 않았다. 관혈류 중 유리 adenosine 농도는 IP 직후에 각 군에서 기준선에 비하여 약 10 20배 정도로 급격히 증가하였고, 재관류후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. I군 및 I+REP군에서는 세포질 및 막 분획의 PKC 활성도에는 차이가 없었다. IP 직후(IP)에는 허혈대조군과 비교하여 두 분획에서 공히 활성도의 차이가 없었으나 IP후 45분간의 허혈을 실시한 군(IP+I)에서 세포질 분획의 활성도는 IP군 보다 유의하게 감소하였으며($p<0.05$) 이후 재관류를 실시한 군(IP+I+REP)에서는 활성도가 현저히 감소하였다($p<0.01$). 반면 막분획의 활성도는 IP+I 군($p<0.05$), IP+I+REP군에서 증가하였다($p<0.01$).

결 론 :

1회의 5분 허혈, 10분 재관류의 IP로 심근괴사 범위의 감소, 재관류후 좌심실기능의 회복 증가 등 뚜렷한 심근보호 효과가 관찰되었다. 이와 같은 심근보호 효과는 IP 시에 세포 내에 급증하는 adenosine과 연관이 있는 것으로 판단되며, PKC 활성 억제제인 calphostin C를 투여한 심장에서 보호효과가 사라진 것으로 미루어 허혈에 대한 IP의 심근보호효과와 PKC는 밀접한 관계가 있는 것으로 추측된다.

IP 및 허혈을 실시한 심장에서 막분획 및 세포질분획의 활성도 증감으로 볼 때 PKC 전이는 보호효과를 일으키는 기전에서 중요한 요소임을 알 수 있었다. 또한 IP 직후보다 허혈을 실시한 이후에 막분획의 활성도가 증가하는 점으로 미루어 심근보호를 수행하는

주 역할은 허혈시기에 일어날 것이라고 추측된다. PKC의 전이 및 허혈 시기에 보호효과가 일어날 것이라는 것은 PKC 동종효소인 PKC-ε에 대한 immunoblotting에 의해서도 확인되었다. 그러나 PKC-δ는 특이한 역할을 하지 않는 것으로 판단된다.

References

1) Murry CE, Jennings RB and Reimer KA : *Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 74 (5) : 1124-1136, 1986.*
2) 김호덕 · 김대중 · 이재경 · 심태섭 · 라봉진 : *Preconditioning*이 허혈-재관류 토끼 심장에 미치는 영향에 관한 연구. 대한순환기학회지 *22 : 418-430, 1992*
3) Li Y, Vasquez J, Gallagher K and Lucchesi B : *Myocardial protection with preconditioning. Circulation 82 : 609-619, 1990*
4) Nao B, McClnahan T, Groh M, Schott R and Gallagher K : *The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs. Circulation. 62 (Suppl Ⅲ) : Ⅲ-271 (Abstract), 1990*
5) Schott RJ, Rohman S, Braun ER and Schaper W : *Ischemic preconditioning reduces size in swine myocardium. Circ Res 66 : 1133-1142, 1990*
6) Iwmoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A and Limura O : *Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen-free radical scavengers in the rabbit. Circulation 83 : 1015-1022, 1991*
7) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H and Kamada T : *Augmentation of adenosine production during ischemia as a possible mechanism of myocardial protection in ischemic preconditioning. Circulation. 84 (Suppl Ⅱ) : Ⅱ-306 (Abstract), 1991*
8) Cave AC and Hearse DJ : *Ischemic preconditioning and contractile function : Studies with normothermic and hypothermic global ischemia. J Mol Cell Cardiol 24 : 1113-1123, 1992*
9) Li Y and Kloner RA : *The cardioprotective effects of ischemic'preconditioning'are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. Circulation 87 : 1642-1646, 1993*
10) Kim DJ, Kim H, Park JI, Shim TS, Rah BJ and Kim HD : *Relation between ischemic preconditioning and the duration of sustained ischemia. J Korean Med Sci 10 : 121-131, 1995*
11) Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Hermann HC and Laskey WL : *Adaptation to ischemia during percutaneous transmural coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic feature. Circulation 82 : 2044-2051, 1990*
12) Cribier A, Korsatz L, Koning R, Rath P, Gamra H, Stix G, Merchant S, Chan C and Letac B : *Improved myocardial ischemic response and enhanced collateral circulation with long repetitive coronary occlusion during angioplasty : A prospective study. J Am Coll Cardiol 20 : 578-586, 1992*
13) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH and Olsson RA : *Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation 84 : 350-356, 1991*
14) Yao Z and Gross GJ : *Role of nitric oxide, muscarinic receptors, and the ATP-sensitive K^+ channel in mediating the effect of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs. Circ Res 73 : 1193-1201, 1993*
15) Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Vairns CB, Bensard DD and Harken AH : *reconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an α1-adrener-gic mechanism. Circ Res 73 : 656-670, 1993*
16) Armstrong SC and Ganote CE : *Effects of protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischemic isolated myocytes. J Mol Cell Cardiol 24 : 869-884, 1992*
17) Ytrehus K, Liu Y and Downey JM : *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol 266 : H1145-H1152, 1994*
18) Armstrong S, Downey JM and Ganote CE : *Preconditioning of rabbit cardiomyocytes : induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. Cardiovasc Res 28 : 72-77, 1994*
19) Takai Y, Kishimoto A, Inoue M and Nishizuka Y : *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue : Ⅰ. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. J Biol Chem 252 : 7603-7609, 1977*
20) Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH and Barnerjee A : *Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. Circ Res 76 : 73-81, 1995*
21) Bogoyevitch MA, Parker PJ and Sugden PH : *Characterization protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-ε is a major isotype present and it is activated by phobol esters, epinephrine, and endotheline. Circ Res 72 : 757-767, 1993*
22) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Inoue M and Kamada T : *Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Implication for myocardial salvage. Circulation 87 : 08-215, 1993*
23) Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Shimamoto K and Iimura O : *Dipyridamol potentiates the myocardial infarct-size limiting effect of preconditioning. Circulation 86 : 979-985, 1992*
24) Yao Z and Gross GJ : *A comparison of adenosineinduced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs :*

efficacy, time course and role of KATP channels. Circulation 89：1229-1236, 1994

25) Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV and Downey JM：*α1-adrenergic agonist preconditions rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. Circ Res 75：576-585, 1994*

26) Shen AS and Jennings RB：*Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. Am J Pathol 67：417-440, 1972*

27) Nayler WG：*The role of calcium in the ischemic myocardium. AM J Pathol 102：262-270, 1981*

28) Disatnik M and Mochly-Rosen D：*Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. Exp Cell Res 210：287-297, 1994*

29) Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H and Simpson PC：*A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. Mol Biol Cell 1：693-706, 1990*

30) Capogrossi MC, Kaku T, Filburn CR, Pelto DJ, Hansford RG, Spurgeon HH and Lakatta EG：*Phobol ester and dioctanoylglycerol stimulate membrane association of protein kinase C and have a negative inotropic effect mediated by changes in cytosolic Ca^{2+} in adult rat cardiac myocytes. Circ Res 66：1143-1155, 1990*

31) Liu Y, Ytrehus K and Dowey JM：*Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol 26：661-668, 1994*

32) Strasser RH, Braun-Dullaeus R, Walendzik H and Marquetant R：*α1-receptor- independant activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia：mechanism for sensitization of adenyl cyclase system. Circ Res 70：1304-1312, 1992*

33) Mochly-Rosen D, Khaner H and Smith BL：*Intracellular receptor activated protein kinase C. Identification of a binding site for enzyme. J Mol Chem 266：14866-14868, 1992*

34) Armstrong A and Ganote CE：*Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes：effects of glycolytic blockade, phobol esters, and ischemia. Cardiovasc Res 28：1700-1706, 1994*

35) Van Winkle DM, Chein GL, Wolff RA, Soifer BE and Davis RF：*Intracoronary infusion of R-phenylisopropyl adenosine prior to ischemia/reperfusion reduces myocardial infarct size in swine. Circulation 86[suppl]；I-213. Abstract, 1992*

36) Grover GJ, Sleph PG, Dzwonczyk S and Sargent CA：*Role of ATP-sensitive potassium channels (KATP) in preconditioning in the dog heart and their interaction with adenosine A1 receptors. Circulation. 86[suppl I]：I341 (abstract), 1992*

37) Brown AM：*Regulation of heartbeat by G-protein coupled ion channels. Am J Physiol 259：H1621-H1628, 1990*

38) Stiles GL：*Adenosine receptors：Physiologic regulation and biochemical mechanisms. NIPS 6：161-165, 1991*

39) Fleming JW, Wisler PL and Watanabe AM：*Signal trasduction by G protein in cardiac tissues. Circulation 85：419-433, 1992*

40) Khalil RA and Morgan KG：*Protein kinase C：a second E-C coupling pathway in vascular smooth muscle? NIPS 7：10-15, 1992*

41) Nishizuka Y：*Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258：607-614, 1992*

42) Maulik N, Engelman RM, Wei ZJ, Lu D, Rouson JA and Das DK：*Interleukin-1α preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury. Circulation 88 (Suppl Ⅱ)：Ⅱ-387-394, 1993*

43) Marber MS, Latchmann DS, Walker JM and Yellon DM：*Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation 88：1264-1272, 1993*

44) Noma A：*ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 305：147-148, 1983*

45) Gross GJ and Auchampach JA：*Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circ Res 70：223-233, 1992*

46) Schultz R, Rose J and Hensch G：*Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels is involved in ischemic preconditioning in swine. Am J Physiol 267：H1341-H1352, 1994*

47) Rohmann S, Weygandt H, Schelling P, Soei LK, Verdouw PD and Lues I：*Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. Basic Res Cardiol 89：563-576, 1994*

48) Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Paulis R, Penta del Peppo A, Chiariello L and Gioffre PA：*Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K^+ channel blocker. Circulation 90：700-705, 1994*

49) Thornton JD, Thornton CS, Sterling DL and Downey JM：*Blockade of ATP sensitive potassium channels increase infarct size but does not prevent preconditioning in rabbit heart. Circ Res 72：44-49, 1993*

50) Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parhams CS and Darbenzio RB：*Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. J Cardiovasc Pharm 26(1)：145-152, 1995*