Original Articles Korean Circulation J 1999;29(6):602-611

허혈성 전처치에 의한 심근보호 효과와 Protein Kinase C 활성과의 관계

중앙대학교 의과대학 조직학교실,[1] 내과학교실,[2] 강원대학교 의과대학 해부학교실[3]
김한철[1] · 김 현[1] · 정성탁[1] · 김태호[2] · 김대중[3] · 라봉진[1] · 김호덕[1]

Cardioprotective Effect of the Ischemic Preconditioning : Its Relation to Activation of Protein Kinase C

Han Chull Kim, MD[1], Hyun Kim, MD[1], Sung Tak Chung, MD[1], Tae Ho Kim, MD[2], Dae-joong Kim, MD[3], Bong-Jin Rah, MD[1] and Ho-Dirk Kim MD[1]

[1]Departments of Histology and [2]Internal Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul
[3]Department of Anatomy, College of Medicine, Kang-won National University, Choon-chon, Korea

ABSTRACT

Background : We tested recent evidences that IP triggers selective activation of protein kinase C (PKC) isozymes using isolated Langendorff-perfused rabbit heart with PKC activator, phorbol ester (PMA, 0.01 nM) or inhibitor (calphostin C, 200 nM). **Methods** : After stabilization of baseline hemodynamics, the hearts were subjected to 45 min global ischemia (Ⅰ) followed by 120 min reperfusion (R) with IP (IP group, n=18) or without IP (ischemic control group, n=16). IP was induced by single episode of 5 min Ⅰ and 10 min R. In the PMA-treated group (n=19) and calphostin C-treated preconditioned group (n=15), PMA and calphostin C was given for 5 and 15 min before 45 min Ⅰ, respectively. Myocardial cytosolic and membrane PKC activities were measured by 32P-γ-ATP incorporation into PKC-specific pepetide ; PKC isozymes were analyzed by Western blot with monoclonal antibodies. **Results** : IP significantly increased the recovery of the LV function including LVDP and coronary flow ($p<0.05$) ; however, enhancement of the functional recovery disappeared by calphostin C or PMA treatment. Cytosolic PKC activity decreased to 82 -76% in the IP and PMA-treated group ($p<0.05$) ; membrane PKC activity increased to 218 -272% ($p<0.01$). However, both fraction of PKC activity was not changed in the calphostin C-treated preconditioned group. In addition, Western blot revealed that PKC-α and ε especially ε were selectively translocated during subsequent sustained ischemia after IP or PMA administration. IP and PMA also reduced infarct size (frim 38 to 10 -20%, $p<0.05$). However, calphostin C blocked infarct reduction effect of IP. **Conclusion** : These results indicate that in isolated rabbit heart model, cardioprotective effect of IP may be related, at least in part, to trigger selective translocation of PKC, especially ε isotype. **(Korean Circulation J 1999;29(6):602-611)**

KEY WORDS : Infarct size · Ischemic preconditioning · Isolated rabbit heart · Protein kinase C isozymes.

논문접수일 : 1999년 3월 19일
심사완료일 : 1999년 5월 7일
교신저자 : 김호덕, 156 - 756 서울 동작구 흑석동 221 중앙대학교 의과대학 조직학교실
전화 : (02) 820 - 5646 · 전송 : (02) 815 - 4814
E - mail : histolog@cau.ac.kr

서 론

1980년대 중반까지만 하더라도 가역적인 손상을 입은 심근은 후속되는 허혈이 있을 때 더욱더 손상받기 쉬운 것으로 생각하였으나[1)2)] Murry등[3)]은 잡종개를 이용하여 허혈 발생 후 5분 이내에 혈류를 재건하면 후속되는 보다 긴 기간의 허혈에도 불구하고 심근세포는 역설적으로 허혈에 대하여 저항성이 있음을 발견하고 짧은 기간 동안의 허혈-재관류 반복에 따른 심근보호 효과를 '허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IP)'라 명명하였다. 이후 실험적으로 IP를 실시하면 재관류시 심장기능 회복 증가, 재관류 유발성 부정맥 발생빈도 감소, 심근경색 크기 감소 등의 보호효과가 있음이 증명되고 있으며[4-15)] 더욱이 심근세포를 보호할 수 있는 새로운 약물의 개발이 가능하다는 관점에서 연구자들의 관심의 대상이 되고 있음은 주지의 사실이다.

아데노신,[16)17)] 스트레스 단백질의 발현[18)19)] 등이 IP의 심근보호 효과와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되는 발생기전에 대한 가설로 제시되었다. 그러나 Li와 Kloner[13)]는 아데노신 억제제를 사용하였음에도 IP효과의 소실을 관찰할 수 없었으며, 스트레스 단백질의 생성을 차단하는 물질을 투여하더라도 IP효과는 소실되지 않았다.[9)20)] 또한 최근에는 α_1-아드레날린성 기전[21-24)] 또는 protein kinase C(PKC)의 활성화,[5)25)26)] 특히 PKC중 어떤 특정한 동종효소의 선택적인 활성화[27-29)] 등이 거론되고 있으나 논란이 많다.

이상으로 연구자들은 첫째, 짧은 기간의 허혈-재관류를 1회 실시하여 IP를 유도한 경우, 심근보호의 유무를 확인하고, 둘째, 심근보호 효과가 있다면 PKC, 특히 어떤 동종효소와 관련있는가를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 재료

일정한 환경 하에서 사육한 New Zealand White종 토끼(체중 1.5 2.0 kg) 53마리를 암수 구별 없이 실험동물로 사용하였다. 무작위로 선택하여 허혈 대조군(ischemic control group, n=16), IP군(preconditioned group, n=18), PKC 활성제 phorbol myristate acetate 투여군(PMA-treated group, n=19), PKC 활성억제제 calphostin C 투여후 IP 실시군(CalC-Preconditioned group, n=15)으로 나누어 실험을 실시하였다. Calphostin C만을 투여했을 때의 기능적인 변화 추이를 보거나(CalC-treated group, n=6) PKC 활성도 변화를 비교하기 위하여 아무런 처치를 하지 않은 실험군(baseline, n=5)을 추가하였다.

실험동물의 처치

모든 실험은 미국 생리학회에서 추천하는 실험동물 사용지침(Guidelines for the Use of Laboratry Animals, American Physiological Society, 1985)에 따라 실시하였다. 적출한 심장을 심장관류장치(Size No. 5, Hugo Sachs Elektroniks, March-Hugstetten, Germany)에 고정하여 non-recirculating Langendorff 방법에 따라 100% 산소로 포화된 Tyrode용액(containing in mM : NaCl 140, KCl 4.4, $CaCl_2$ 1.5, $MgCl_2$ 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0 ; pH 7.4)으로 관류하였다. 관류액의 온도와 심장을 매다는 방(water-jacketed heart chamber)의 온도는 37℃로, 관류압과 관류량은 각각 60 mmHg, 35 ml/min으로 유지하였다.

실험안

전체적인 실험안은 Fig. 1과 같다. 요약하면 suction electrode를 우심방 외벽에 2 3mm 간격으로 붙여 전기자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)로 1분당 심박동수가 150이 되도록 조정하여(4V, 0.5 msec interval) Tyrode용액으로 관류하여 심장기능이 일정히 유지되도록 한 후(이 기간을 기준 혈역학(baseline hemodynamics) 값으로 설정하였다) 실험을 실시하였다. 허혈 대조군에서는 IP없이 45분 동안 관류를 차단하여 전체 허혈후 120분 동안 재관류하였으며 IP군에서는 5분 동안의 전체 허혈과 10분 동안의 재관류를 1회 실시하여 IP를 유도한 후 대조군에서와 같이, PMA 투여군에서는 PMA를 Tyrode용액에 희석하여(최종농도 0.01 nM) 5분 동안 관류한 후 10분 동안 Tyrode용액으로 wash-out하고 대조군에서와 같이 45분 동안 전체허혈후 120분 동안 재관류하였다. CalC 투여후 IP군에서는 CalC를 Tyrode용액에 희석하여(최종농도 200 nM) IP 실시 5분전부터 관류하기 시작하여 IP 기간 동안 계속하였

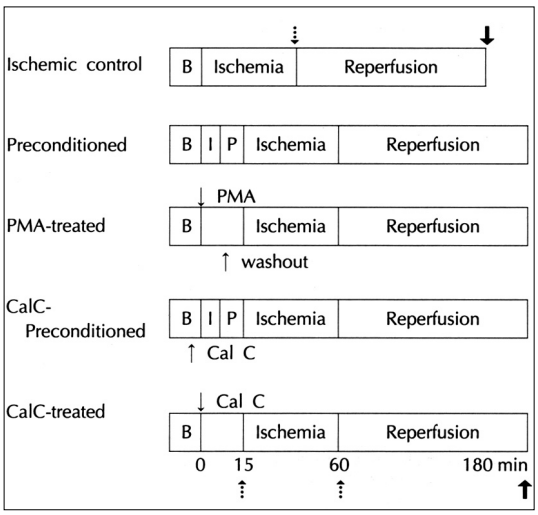

Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. In the PMA (phorbol myristate acetate)-treated group, PMA (0.01 nmol/L) was perfused for 5 minutes and then washed out for 10 minutes ; in the calphostin C (CalC)-Preconditioned group, CalC (200 nmol/L) was perfused from 5 minutes prior to ischemic preconditioning (IP) before subsequent sustained ischemia. B, baseline. ↕ indicates PKC immuno- blotting and ⬆indicates PKC activity assay.

으며, CalC 자체가 심근기능에 미치는 영향을 보기 위하여 기준선 값이 유지되면 15분 동안 CalC를 투여하고 45분 동안 허혈, 120분 동안 재관류를 실시하였다. 기준선에서의 PKC활성도 측정을 위한 실험군에서는 아무런 처치없이 50분 동안 관류만을 실시하였다. PKC 활성도 측정을 위한 시료들은 실험종료후 급속 냉동하여 측정 때까지 -80℃에 보관하였다.

좌심실기능 및 관혈류의 측정

기준선의 혈역학 값이 일정하게 유지되면 카뉼라에 연결된 라텍스 고무풍선(size 10, Hugo Sachs Elektroniks)을 폐정맥을 통하여 좌심실에 삽입하고 압력전달장치(pressure transducer, Harvard Apparatus)에 연결하였다. 정밀주사기로 라텍스 고무풍선에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 8 10 mmHg가 되도록 조정한 후 실험안에 따라 좌심실압(left ventricular pressure), 수축력(좌심실압의 미분값, dP/dt), 심박동수 등을 4-channel 기록기(rectilinear polygraph, Watanabe Graphtech, Tokyo, Japan)에 각각 기록하였다.

관류를 시작하여 심장기능이 일정히 유지되면 관류액의 누출을 방지하기 위하여 폐정맥과 대정맥을 견봉합사로 묶은 후 폐동맥을 통하여 우심실내로 카뉼라를 삽관하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하였다. 실험안에 따라 정해진 시점에서 우심실에서 흘러 나오는 관류액을 1분 동안 모아 관혈류 측정에 이용하였으며 값은 ml/min으로 표기하였다.

경색크기 측정

각 실험 종료후 심장을 관류장치로부터 분리하여 실온에서 1% triphenyltetrazolium chloride(TTC, pH 7.4)에 20분 동안 침적한 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정된 심장을 심저부와 평행하는 방향으로 2 mm 간격으로 횡절단한 후 심저부를 향하는 횡단면을 Kodak Ektachrome 필름(ISO 100)으로 사진촬영하여 경색크기 측정에 사용하였다. 환등 필름을 영사막에 투사하고 심실중격을 포함하는 좌심실 횡단면과 경색부위의 단면(infarct area, IA)을 추적, 구적계(area-curve meter, Ushikata X-plan 360dII, Tokyo, Japan)로 경색부위의 밀도를 구하여 이를 경색크기로 간주하였다. 경색크기의 측정은 훈련된 세 사람이 같은 표본을 3회 이상 측정하여 평균값을 그 표본의 대표값으로 간주하였다.

Protein kinase C(PKC) 활성도 측정 및 immunoblotting

PKC활성도는 Takai 등[30]의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 실험 중 정해진 시점 또는 종료 시점에서 좌심실(심실중격 포함)을 분리하여 20 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1.0 mM iodoacetic acid, 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1.0 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1.0 mM ethylene glycolbis (β-aminoethyl ether) N,N,N′,N′- tetraacetic acid, 10 mM β-mercaptoethanol(pH 7.4, 4℃)을 함유한 용액을 첨가하여 균질화한 후 4℃하에서 100,000 g로 1시간 동안 원심분리하여 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다. 침전물을 다시 위의 용액에 Triton X-100 (0.3 vol%)을 첨가한 용액으로 녹여 4℃하에서 1시간 동안 교반하고 원심분리하여 상청액을 세포막 분획으로 사용하였다. 각 분획의 활성도는 PKC assay system(Amersham RPN77)을 사용하여 측정하였다. 즉, 각각의 시료 10 μg을 0.2 μCi의 ^{32}P-γ- ATP

(sepecific activity, 3,000 Ci/mmol/l, Amersham)와 함께 15분 동안 반응시킨 후 방사능을 측정하여 PKC 활성도를 계산하였다. 이상의 방법을 각 시료당 3회 실시하여 평균을 취하였으며, 기준선의 PKC활성도는 허혈이나 IP없이 관류시작후 50분 동안 기준선의 혈역학 값이 일정히 유지되게 하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 측정값은 모두 pmol/g tissue로 표기하였다.

각 실험군별로 좌심실 500 mg을 적출하여 SDS-sample buffer를 첨가한 후 조직파쇄기(Ultra-Turrax T-25, Germany)로 균질화(3×30 sec, 10,000 rpm)하고 1시간 동안 원심하여(20,000 g, 4℃) 상청액을 전기영동 시료로 사용하였다. 각 군별로 추출된 단백질(100 μg)을 Laemmli[31]의 방법에 따라 25 mA에서 5시간 동안 전기영동하였다. 분리된 단백질들을 polyvinylidene difluoride membrane에 이적시켜 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위하여 5% skim milk를 함유하는 Tris-buffered saline/Tween 20(TBST : 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)으로 실온에서 1시간 동안 처리한 후 각각의 일차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 씻어준 후 2차항체로 실온에서 1시간 동안 반응시키고 다시 씻어준 후 enhanced chemiluminiscence kit (Amersham)를 이용하여 각각의 단백질 띠를 확인하였다. 이상과 같은 방법으로 각각 세 번씩 immunoblotting을 실시하여 PKC 동종효소 중 다섯 가지(α, β, δ, ε 및 ζ)의 변화 또는 출현 여부를 동정하였다.

통계처리

모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였다. 대조군을 포함한 실험군들 사이에서 통계학적인 유의성을 보기 위하여 분산분석을 실시하여 유의성이 있다고 판단되면 Tukey's post-hoc test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

좌심실의 기능적 척도들의 변화

좌심실 수축기 최대압(left ventricular systolic peak pressure)에서 이완말기압(end-diastolic pressure)을 뺀 값인 LV developed pressure(LVDP)는 재관류 시간 경과에 따라 증가하였으나 대부분에서 재관류후 45분경 부터는 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며 허혈 대조군을 포함한 다른 실험군에 비하여 특히 IP군에서 유의한 증가를 볼 수 있었다(Fig. 2). dP/dt의 최대값은 재관류 시간 경과에 따라 증가하였으나 모든 군에서 재관류후 45분 경부터는 일정히 유지되는 경향을 나타내었다. 특히 CalC 투여후 IP군에서 가장 낮았으며 허혈 대조군을 포함한 다른 실험군에 비하여 IP군에서는 유의한 증가를 볼 수 있었다(Fig. 3). 심박동수는 모든 실험군에서 재관류후 10분 경부터 기준선에 접근하여 유지되는 경향을 나타내었으나 실험군 사이에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. LVEDP는 재관류 초

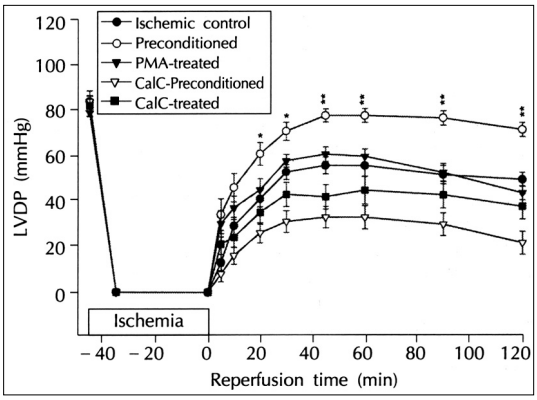

Fig. 2. Changes in the left ventricular developed pressure (LVDP) during ischemia and reperfusion. In comparison with others, LVDP recovery increased in the preconditioned group. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. *p<0.05, **p<0.01, ischemic control (or PMA-treated) vs preconditioned.

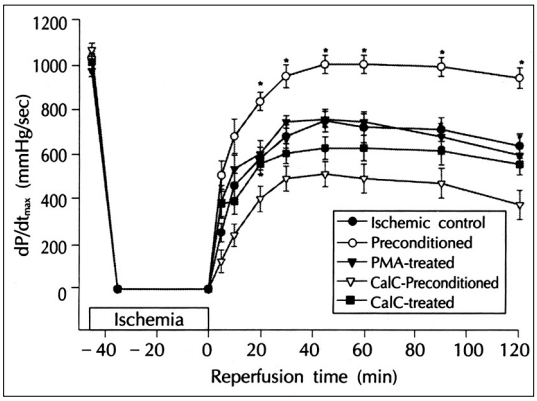

Fig. 3. Changes in the left ventricular contractility (dP/dtmax) during ischemia and reperfusion. In compariso with others, recovery of the contractility increased in the preconditioned group. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. *p<0.01, ischemic control (or PMA-treated) vs preconditioned.

기에는 상승하였다가 시간이 경과할수록 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. IP군과 PMA 투여군 사이에서는 유의한 차이가 없었으며 특히 이들은 허혈 대조군, CalC 투여후 IP군 및 CalC 투여군에 비하여 재관류후 30분부터 90분 사이에서 LVEDP의 상승폭이 현저히 낮았다(Fig. 4). 관혈류량은 재관류 시작후 증가하여 허혈 대조군이나 IP군에서는 비교적 일정한 값으로 유지되었으나 다른 실험군에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 IP군에서는 다른 실험군보다 관혈류의 현저한 증가를 볼 수 있었으며 CalC 투여후 IP군에서는 가장 낮은 값을 나타내었다(Fig. 5).

심근경색 크기

심첨에서 심저부에 이르기까지의 모든 절편(8 9개)을 TTC로 염색하여 검색한 결과 심근경색 부위는 대부분에서 심첨으로부터 4번까지의 절편에서 뚜렷히 관찰되었다. 심근경색 크기는 허혈 대조군, IP군, PMA 투여군, CalC 투여후 IP군에서 각각 37.7±2.4, 20.3±1.2, 10.0±2.1, 33.7±1.8%로 IP군과 PMA 투여군에서 경색크기의 유의한 감소를 볼 수 있었으며 특히 PMA 투여군에서 현저히 감소하였다(Fig. 6). 그러나 IP에 의한 괴사크기 감소현상은 CalC를 투여하면 소실되었다.

Protein kinase C(PKC) 및 동종효소의 변화

기준선의 세포질 분획 및 세포막 분획의 PKC활성도는 각각 7307.71±310.55, 1834.18±20.98 pmol/g tissue이었다. 허혈 대조군에서 세포질 분획 및 세포막 분획의 PKC활성도는 각각 7666.95±393.57, 1854.018±0.46 pmol/g tissue 였으며, IP군에서는 각각 5980.40±205.32, 3994.77±140.26 pmol/g tissue, PMA 투여군에서는 각각 5581.67±205.32, 4981.92±82.76 pmol/g tissue, CalC 투여후 IP군에서는 각각 7219.06±259.89, 2026.12±49.06 pmol/g tissue으로 IP를 시행하거나 PMA를 투여하면 세포질 분획의 PKC 활성도는 각각 기준선 값의 82%, 76%까지 유의하게 감소하였으며($p<0.05$) 세포막 분획의 활성도는 각각 기

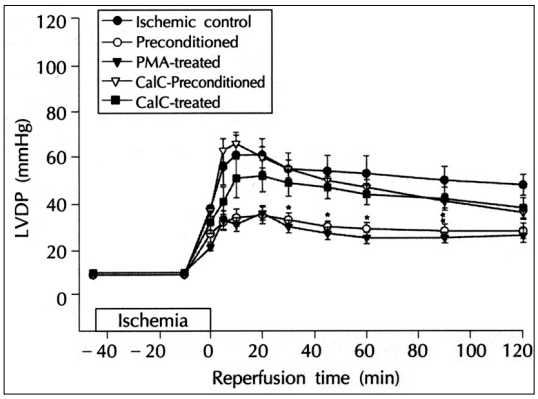

Fig. 4. Changes in the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) during ischemia and reperfusion. In comparison with others, extent of increase of the LVEDP was reduced by ischemic preconditioning or PMA-treatment. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. *p<0.05, **p<0.01, ischemic control vs preconditioned.

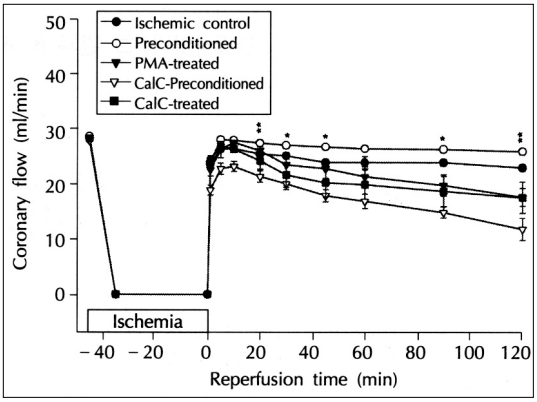

Fig. 5. Chanages in the coronary flow during ischemia and reperfusion. In comparison with others, recovery of the coronary flow was evident in the preconditioned group. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. *p<0.05, **p<0.01, ischemic control vs preconditioned.

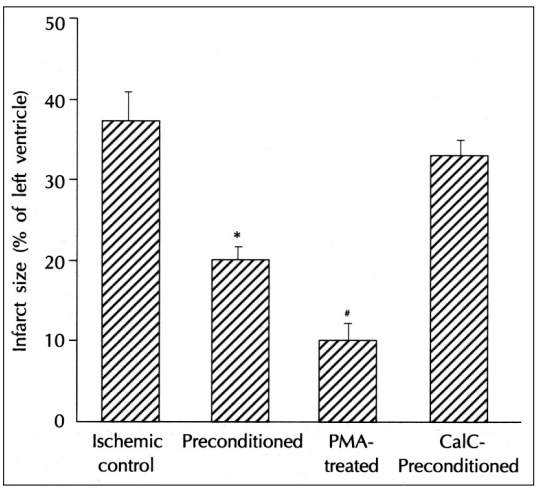

Fig. 6. Infarct size. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. Infarct size was significantly reduced in the preconditioned and PMA-treated groups. *p<0.05, ischemic control vs preconditioned ; #p<0.01, ischemic control vs PMA-treated.

준선 값의 218%, 272%까지 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 CalC를 투여하면 이상과 같은 PKC활성도의 감소나 증가는 소실되었다(Fig. 7). 이러한 결과로 미루어 IP를 실시하면 세포질 PKC가 활성화되어 세포막으로 이동하는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 PKC 중 α, β, δ, ε, ζ 등 다섯 가지의 동종효소에 대한 발현을 각각에 대한 단클론항체를 이용하여 Western blot로 관찰하였다. 그 결과 β, δ, ζ 등에서는 유의한 변화가 없었던 반면 α 및 ε에서 양적인 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 허혈 대조군과 비교하여 PKC-α의 세포질 분획은 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈직후(IP+I), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈직후(PMA+I), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 모두 증가하였으며 특히 IP직후(IP) 또는 PMA 투여직후(PMA)에서 현저히 증가하였다. PKC-α의 세포막 분획은 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈직후(IP+I), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈직후(PMA+I), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 모두 증가하였으며 특히 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 증가하였다. 허혈 대조군과 비교하여 PKC-ε의 세포질 분획은 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 증가하였다. IP후 45분 동안 허혈직후(IP+I) 또는 PMA 투여후 45분 동안 허혈직후(PMA+I)에는 허혈 대조군에 비하여는 증가되었으나 다른 군에 비하여는 감소하였다. PKC-ε의 세포막 분획은 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈직후(IP+I), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈직후(PMA+I), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 모두 증가하였으며 특히 IP직후(IP), IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(IP+I+R), 또는 PMA 투여직후(PMA), PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류하였을 때(PMA+I+R) 증가하였으나, 세포질 분획과 비교하면 IP후 45분 동안 허혈직후(IP+I) 또는 PMA 투여후 45분 동안 허혈직후(PMA+I)에 증가되었다. 이는 PKC-ε이 이 기간중에 활성화되어 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였음을 나타내는 것이다.

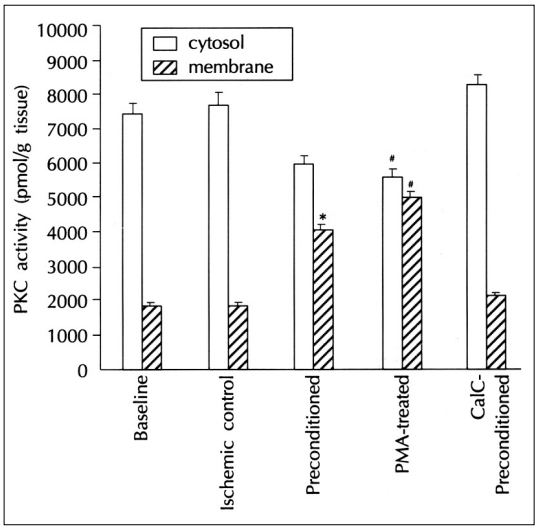

Fig. 7. PKC activity. Cytosol PKC activity decreased by PMA treatment ; those of membrane increased by ischemic preconditioning or PMA treatment. CalC, calphostin C ; PMA, phorbol myristate acetate. *p<0.01, baseline vs preconditioned ; #p<0.01, baseline vs PMA-treated.

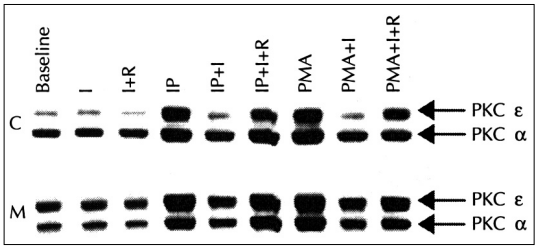

Fig. 8. PKC isozymes determined by Western blot. PKC-a and e, especially e, were selectively translocated during subsequent sustained ischemia after IP or PMA administration. I, 45 min ischemia ; IP, ischemic preconditioning ; R, 120 min reperfusion ; PMA, phorbol myristate acetate. C, cytosol fraction ; M, membrane fraction.

고 찰

본 실험에서는 적출 관류 심장을 이용, 5분 동안의

허혈, 10분 동안의 재관류를 1회 실시하여 IP를 유도한 후 45분 동안 허혈후 재관류시, 1) IP에 의한 심근보호 효과가 나타나며, 2) 그 효과는 PKC와 어떠한 연관성이 있는가를 관찰하였다. 이를 위하여 PKC 활성촉진제인 PMA와 활성억제제인 CalC를 투여한 실험을 병행하고 그 결과를 서로 비교하였다.

IP가 좌심실기능 및 형태학적 변화(경색크기)에 미치는 영향

실험결과 45분 동안 허혈후 LVDP는 허혈 대조군, PMA나 CalC를 투여한 실험군에 비하여 특히 IP군에서 유의하게 증가하였다. dP/dt도 LVDP의 회복 경향과 유사하였으나 특히 CalC 투여군에서 가장 낮았으며 허혈 대조군을 포함한 다른 실험군에 비하여 IP군에서는 유의하게 증가하였다. LVEDP는 IP군과 PMA투여군 사이에서는 유의한 차이가 없었으나 IP군과 PMA 투여군은 허혈 대조군, CalC 투여군에 비하여 재관류 시작 후 30분부터 90분 사이에서 상승폭이 현저히 낮았다. 관혈류량은 다른 실험군에서는 감소하는 경향을 나타내었는데 IP군에서는 회복이 현저히 증가하였으며 CalC 투여군에서는 가장 낮았다. 심근경색 크기는 허혈 대조군에서 38%인데 비하여 IP를 실시하거나 PMA를 투여하면 20 10%로 현저히 감소하였으나, CalC를 투여하면 경색크기 감소효과가 소실되었다. 이상으로 IP를 실시하면 이어지는 보다 긴 기간 동안의 허혈에도 불구하고 재관류시 심장기능이나 관혈류 회복이 증가되며 경색크기가 현저히 감소하는 등 심근보호 효과가 있음을 확인할 수 있다. 그러나 이전에 토끼[15)32)]나 돼지[33)]를 이용한 연구에서는 IP를 실시했음에도 심장기능 회복은 관찰할 수 없었다. 이는 IP유도를 위하여 짧은 기간 동안 허혈-재관류를 1 4회 반복하였는데 토끼는 IP에 대한 역치(threshold)가 낮아 짧은 기간이나 허혈-재관류의 반복은 오히려 심근기절현상(myocardial stunning)을 악화시키기 때문으로 추측된다. 최근의 연구결과, IP유도를 위한 허혈-재관류의 회수가 증가할수록 오히려 경색크기가 커지는 등 심근보호 효과가 감소됨이 관찰되었는데[34)] 이와 같은 결과는 짧은 기간 동안이라 하더라도 허혈-재관류의 반복으로 심근기절현상이 증가될 수 있음을 시사하는 것이다. 한편, Cave와 Hearse,[12)] Zhai 등[35)] 등은 흰쥐의 적출심장을 이용한 실험에서 IP후 160분에 이르는 매우 긴 기간 동안의 허혈에도 불구하고 관혈류나 심박출량이 증가하는 등의 심장기능 증가를 관찰하였다. 그들도 본 실험에서와 같이 5 10분 동안의 허혈-재관류를 1회 실시하여 IP를 유도하였는데 흰쥐는 토끼와 비교하여 IP에 대한 역치가 높으며[36)] 생화학적으로도 흰쥐의 심장은 토끼와 차이가 있고[37)] 또한 기니픽에서는 5 10분 동안의 허혈-재관류 1회 실시로 심근기절현상에서 나타나는 여러 가지 현상들을 볼 수 없었다[38)]는 결과로 미루어 흰쥐에서 5 10분 동안의 허혈-재관류 1회 실시만으로 후속된 보다 긴 기간의 허혈에도 불구하고 심근경색 크기의 감소 등 IP효과를 볼 수 있는가 하는 점에 대하여는 논란의 여지가 있다.

IP와 PKC활성화의 관계

본 실험결과 기준선의 세포질 분획 및 세포막 분획의 PKC활성도는 기준선 값과 비교하여 IP를 시행하거나 PMA를 투여하면 세포질 분획의 PKC 활성도는 각각 기준선 값의 82 76%까지 유의하게 감소하였으며 세포막 분획의 활성도는 각각 기준선 값의 218%, 272%로 현저히 증가하였다. 그러나 CalC를 투여하면 허혈 대조군에서 나타난 것과 같이 세포질이나 세포막 분획의 PKC활성도의 감소나 증가는 소실되었다. 이와 함께 본 실험에서는 5종류의 PKC 동종효소(α, β, δ, ε 및 ζ)의 발현 양상을 각 동종효소에 대한 단틀론항체를 이용하여 Western blot로 관찰했는데 다른 실험군에서는 변화가 없었던데 비하여 PKC-ε의 세포막 분획은 IP후, IP후 45분 동안 허혈후, IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류했을 때, 또는 PMA 투여후, PMA 투여후 45분 동안 허혈후, PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류했을 때 모두 증가하였으며, 특히 IP후, IP후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류했을 때, 또는 PMA 투여후, PMA 투여후 45분 동안 허혈후 120분 동안 재관류했을 때 증가하였으나, 세포질 분획과 비교하면 IP후 45분 동안 허혈후 또는 PMA 투여후 45분 동안 허혈후에 증가되었다. 이와 같은 결과는 IP를 실시하거나 PMA를 투여하면 45분 동안 허혈후의 심근조직에서 α 및 ε의 세포질 분획과 세포막 분획이 각각 감소하거나 증가하며 특히 PKC-ε은 이 기간 중에 활성화되어 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였음을 나타내는 것이다. Ping 등[29)]은 토끼를 이용하여 5분 허혈-10분 재관류를 1 6회 실시하여

IP를 유도한 직후 PKC의 변화를 관찰하였는데 PKC의 총활성도에는 차이가 없었으나 PKC-ε과 η가 세포막 쪽으로 이동하였으며 특히 ε은 허혈-재관류의 증가 횟수에 따라 직선적으로 증가함을 관찰하고 ε과 η가 IP효과와 관계 있음을 시사하였다. 토끼와는 달리 적출 흰쥐 심장을 이용한 실험에서 α_1 아드레날린성 작용경로의 제2전달체인 diacyl-glycerol(DAG)을 투여한 결과 PKC-δ가 세포질에서 세포막으로 이동함이 관찰되었다.[28] 본 실험결과와 이들의 결과를 종합하여 볼 때 적출 토끼 심장에서는 IP를 실시하면 적어도 PKC-ε의 선택적인 활성화가 일어나며 이와 연계되어있 세포내 신호전달체계의 활성화로 심근보호 효과가 나타나는 것으로 추측된다.

Ytrehus 등[26]은 적출 토끼 관류 심장을 이용한 실험에서 PMA를 투여하면 심근경색 크기가 축소되며 PKC 활성억제제인 staurosporine을 투여한 결과 IP효과가 차단됨을 관찰하고 PKC활성화는 IP효과에 필요한 조건임을 시사하였다. 다시 말하면 IP로 심근세포에서는 세포밖으로 아데노신 방출이 증가되어 아데노신 수용기 점유가 일어나며 연속적으로 PKC활성화가 일어나 이온통로, 미세관(microtubule) 등 단백질 효과기(protein effector)의 인산화로 활성화되고, 이에 따라 심근수축력 증가가 수반되어 심근보호 효과가 나타나는 것으로 추측되고 있다. 이러한 가설과 연관하여 Armstrong과 Ganote[25]는 인산효소 차단제인 okadaic acid를 사용하여 단백질 효과기들을 인산화시켜 심근보호 효과가 나타남을 관찰하였고, Downey 등[37]은 미세관활동을 억제하는 colchicine을 사용하여 IP효과가 차단됨을 확인하였다. Protein kinase의 기능은 아직도 완전히 밝혀져 있지 않으나 세포의 종류에 따라 특이적으로 세포내 신호전달체계와 깊은 연관성을 가지며 특히 여러 가지 활성물질과 반응하는 것으로 알려져 있다. 심근세포와 유사한 성질을 가진 진핵세포에서는 A_1아데노신 수용기와 G 단백질이 결합하여 phospholipase C가 활성화되면 세포막의 인지질이 분해되어 DAG를 형성하며 DAG는 PKC를 활성화하여, 이로부터 어떤 key protein을 인산화하는 것으로 알려져 있으나[37] 이상은 PKC활성촉진제나 차단제를 사용하여 얻은 결과이므로 최종 효과기에 대하여는 논란이 있다. 적출 토끼 심장을 이용한 실험결과 IP에 의한 세포막 분획의 PKC 활성화는 후속되는 허혈기간 중에 일어남이 최근 연구에서 관찰되었다.[39] 이상의 결과는 IP에 의하여 세포질에서 세포막으로 PKC가 전위됨을 의미하며 IP는 PKC를 활성화하는 방아쇠(trigger)로서 작용함을 시사하는 것이다. 따라서 IP를 실시할 경우 비활성 PKC가 세포막과 같은 활동성이 큰 세포 소기관에서 활성화되어 세포막에 존재하는 효과기들이 이차적으로 활성화됨으로서 나타나는 것으로 믿어진다. 그러나 개를 이용한 실험에서는 PKC활성촉진제를 투여하더라도 경색크기에는 차이가 없었으며,[40] 더욱이 돼지에서는 PKC차단제를 사용했음에도 오히려 경색크기의 감소가 관찰되었다.[41] 이와 같은 상반된 결과의 원인은 명확치 않으나, 1) IP에 의한 PKC활성이 key protein의 인산화에는 영향을 미치지 못하였거나, 2) 세포막 분획 PKC의 총량은 증가하였음에도 특이적인 PKC 동종효소의 발현이 심근세포 보호에 관여할 수 있을 정도로 크지 않았던지, 3) 또는 분자생물학적인 인자보다는 기계적인 인자에 의하여 심근기절현상을 감소시킬 수 없음으로 인하여 나타난 결과임을 배제하기 어렵다. 이상과 같이 실험동물이나 IP 유도방법에 따라 상반된 결과가 나타나는 점으로 볼 때 아데노신이나 PKC가 IP효과와 일부 관련성이 있으나 모든 동물에서 공통적으로 관여하는 기전은 아닌 것 같다.

이상으로 적출 관류 토끼심장에서는 허혈-재관류 1회 실시로 유도된 IP로 후속된 보다 긴 기간 동안(45분)의 허혈에도 불구하고 재관류시 심장기능의 회복증진, 심근경색 크기 감소 등의 보호효과가 있으며, 이는 아마도 부분적으로 세포막 분획의 PKC활성화, 특히 PKC-ε의 선택적 활성화가 중심역할을 하는 것으로 생각된다.

요 약

연구 배경 :

허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IP)를 실시하면 protein kinase C(PKC), 특히 동종효소중 α나 ε 등의 활성화로 심근보호 효과가 나타날 것이라는 실험결과들이 제시되고 있으나 논란이 많다. 본 연구에서는 적출 토끼 심장을 이용하여 PKC활성촉진제 phorbol ester(PMA, 0.01 nM) 또는 억제제 calphostin C (CalC, 200 nM)를 투여한 후 심근세포내의 PKC활성도를 정량분석하고 PKC 동종효소의 발현을 관찰하여 IP효과의 관계를 알아보고자 하였다.

방 법:

Langendorff방법에 따라 전체 허혈(5분) - 재관류(10분) 1회 실시로 IP를 유도하고 45분 동안 전체 허혈후 120분 동안 재관류하였다(IP군, n=18). 허혈 대조군에서는 IP없이 45분 동안 전체 허혈후 120분 동안 재관류를 실시하였다. PMA투여군에서는 5분 동안 PMA를 투여한 후 10분 동안 washout하고 45분 동안 허혈을 실시한 후 120분 동안 재관류하였으며, CalC투여군에서는 IP 5분전부터 IP기간중에 CalC를 투여하고 45분 동안 허혈, 120분 동안 재관류를 실시하였다. 모든 실험 종료후 또는 IP만 실시, IP후 45분 동안 허혈만 실시, PMA투여직후의 좌심실 심근조직에서 심근세포 세포질 및 세포막 PKC 분획을 PKC - specific peptide와 ^{32}P - γ - ATP incorporation으로 활성도를 측정하였으며 동종효소의 발현정도는 Western blot으로 비교하였다. 허혈후 재관류 기간 동안 좌심실 기능, 관혈류 등을 측정하였으며 심근경색 크기는 1% tetrazolium으로 염색하여 형태계측하였다.

결 과:

45분 동안 허혈후 LVDP는 허혈 대조군을 포함한 다른 실험군에 비하여 특히 IP군에서 유의한 증가를 볼 수 으며($p<0.01$) dP/dt의 최대값(dP/dt max)은 CalC 투여군에서 가장 낮았으며 허혈 대조군을 포함한 다른 실험군에 비하여 IP군에서는 유의한 증가를 볼 수 있었다($p<0.01$). IP군과 PMA 투여군은 허혈 대조군, CalC 투여군에 비하여 재관류후 30분부터 90분 사이에서 LVEDP의 상승폭이 현저히 낮았다($p<0.05$). 관혈류량은 IP군에서 다른 실험군보다 현저히 증가하였으며 CalC 투여군에서는 가장 낮은 값을 나타내었다($p<0.01$). 심근경색 크기는 허혈 대조군(38%)에 비하여 IP군(20%)과 PMA 투여군(10%)에서 현저히 감소하였으나 CalC를 투여하면 감소효과는 소실되었다. IP를 시행하거나 PMA를 투여하면 세포질 분획의 PKC 활성도는 각각 기준선 값의 82%, 76% 까지 유의하게 감소하였으며($p<0.05$) 세포막 분획의 활성도는 각각 기준선 값의 218%, 272% 까지 유의한 증가를 나타내었다($p<0.01$). 그러나 CalC를 투여하면 이상과 같은 PKC 활성도의 감소나 증가는 소실되었다. 이와 함께 IP군이나 PMA 투여군에서 45분 동안 허혈 기간중에 PKC - α 및 ε 동종효소의 세포질 분획과 세포막 분획은 각각 감소하거나 증가함을 Western blot으로 확인할 수 있었다.

결 론:

이상으로 적출 관류 토끼 심장에서도 IP를 실시할 경우 후속된 장시간 동안의 허혈에 대하여 좌심실기능 증가, 심근경색 크기감소 등의 보호효과가 있으며 이는 PKC - α, ε, 특히 ε의 세포막 분획 PKC 활성화와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

중심 단어 : C - Fos 단백질 · 내측전정신경핵 소뇌 · 전정보상 · 일측전정기관 손상.

■ **감사문**

본 연구는 1997년도 교육부학술연구조성비(기초의학 과제번호 186) 및 1998년도 중앙대학교 연구기자재 구입지원 프로그램으로 이루어졌습니다. 관계자 여러분 및 동물사육 및 실험을 보조해준 조직학교실의 이상동 선생님께 감사드립니다.

REFERENCES

1) Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. *Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, function and ultrastructural studies. Am J Cardiol 1983;52:72A-81A.*
2) Hearse DJ, Yellon DM. *Why are we still in doubt about infarct size limitation? The experimentalist's viewpoint. In: Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation. Hearse DJ, Yellon DM, editors, New York: Raven Press;1984. p.17-41.*
3) Murry CE, Jennings RB, Kloner RA. *Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.*
4) Kim HD, Kim DJ, Lee JK, Shim TS, Rah BJ. *Effect of preconditioning on postischemic reperfused rabbit heart. Korean Circ J 1992;22:418-30.*
5) Yoo HJ, Park JS, Kim H, Ryoo UH, Rah BJ, Kim HD. *Ischemic preconditioning in isolated rabbit heart: effect on left ventricular function, infarct size, and protein kinase C. Korean Circ J 1996;26:541-52.*
6) Li Y, Vasquez J, Gallagher K, Lucchesi B. *Myocardial protection with preconditioning. Circulation 1990;82: 609-19.*
7) Nao B, McClanahan T, Groh M, Schott R, Gallagher K. *The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs. Circulation 1990;82(Suppl Ⅲ):Ⅲ-271.*
8) Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. Circ Res 1990;66:1133-42.*
9) Thornton JD, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley AWH, Van Winkle DM, *et al. Inhibition of protein synthesis does not block protection afforded by preconditioning. Am J Physiol 1990;259:H1822-H1825.*
10) Iwamoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A, *et al. Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen-free radical scavengers in the rabbit. Circulation 1991; 83:1015-22.*
11) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Kamada T. *Augmentation of adenosine production during ischemia*

as a possible mechanism of myocardial protection in ischemic preconditioning. Circulation 1991;84(Suppl Ⅱ): Ⅱ-306.

12) Cave AC, Hearse DJ. *Ischemic preconditioning and contractile function: Studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. J Mol Cell Cardiol 1992;24: 1113-23.*
13) Li Y, Kloner RA. *The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. Circulation 1993;87:1642-8.*
14) Kim HD, Kim H, Rah BJ. *Ischemic preconditioning does not attenuate post-ischaemic reperfusion dysfunction but has an infarctlimiting effect. Eur Heart J 1994;15(Suppl):143.*
15) Kim DJ, Kim H, Park JI, Shim TS, Rah BJ, Kim HD. *Relation between ischemic preconditioning and the duration of sustained ischemia. J Korean Med Sci 1995;10:121-31.*
16) Thornton JD, Van Winkle DM, Downey JM. *Preconditioning protection is mediated through adenosine receptors. Circulation 1990;82(Suppl Ⅲ):Ⅲ-464.*
17) Downey JM. *The role of adenosine in preconditioning. J Mol Cell Cardiol 1991;23(Suppl Ⅲ):S.28.*
18) Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. *Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. Circ Res 1988;63:543-9.*
19) Knowlton AA, Brecher P, Ngoy S, Apstein CS. *Brief cardiac ischemia induces expression of heat shock protein 70. Circulation 1989;80(Suppl Ⅱ):Ⅱ-237.*
20) Downey JM, Thornton JD, Liu GS, Stanley AWH. *Preconditioning does not involve synthesis of a protective protein. Circulation 1990;82(Suppl Ⅲ):Ⅲ-271.*
21) Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, *et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an α_1-adrenergic mechanism. Circ Res 1993;73:656-70.*
22) 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: Implications for myocardial salvage. Circulation 1993;87:208-15.*
23) Thornton JD, Daly JF, Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. *Catecholamines can induce adenosine receptor-mediated protection of the myocardium but do not participate in ischemic preconditioning in the rabbit. Circ Res 1993;73:649-55.*
24) Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ. *Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium. Implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. Circulation 1993;88[part 1]: 2351-8.*
25) Armstrong SC, Ganote CE. *Effects of protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischaemic isolated myocytes. J Mol Cell Cardiol 1992;24:869-84.*
26) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol 1994;266:H1145-H1152.*
27) Kim H, Kim DJ, Kim SS, Rah BJ, Kim HD. *The cardioprotective effect of ischemic preconditioning: role of adenosine and protein kinase C. Korean Circ J 1997;27: 1004-16.*
28) Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown J, Harken AH, Banerjee A. *Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. Circ Res 1995;76:73-81.*
29) Ping P, Zhang J, Qui Y, Tang X-L, Manchikalapudi S, Cao X, *et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms ε and η in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. Circ Res 1997;81:404-14.*
30) Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, 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 1977;252:7603-9.*
31) Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970;227:681-5.*
32) Jenkins DP, Pugsley WB, Yellon DM. *Ischemic preconditioning in a model of global ischemia: Infarct size limitation, but no reduction of stunning. J Mol Cell Cardiol 1995;27:1623-32.*
33) Miyamae M, Fujiwara H, Kida M, Yokota R, Tanaka M, Katsuragawa M, *et al. Preconditioning improves energy metabolism during reperfusion but does not attenuate myocardial stunning in porcine hearts. Circulation 1993; 88:223-34.*
34) Iliodromitis EK, Papadopoulos C, Katritsis D, Kyriakides ZS, Bofilis E, Kremastinos DT. *Protection against the infarct size is lost after repetitive preconditioning stimuli in rabbits. J Mol Cell Cardiol 1996;28:A28.*
35) Zhai X, Lawson CS, Cave AC, Hearse DJ. *Preconditioning and post-ischaemic contractile dysfunction: The role of impaired oxygen delivery vs extracellular metabolite accumulation. J Mol Cell Cardiol 1993;25:847-57.*
36) Liu Y, Downey JM. *Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. Am J Physiol 1992;263: H1107-H1112.*
37) Downey JM, Liu Y, Ytrehus K. *Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning. In: Ischemic Preconditioning. The Concept of Endogenous Cardioprotection. Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM, editors. Boston: Kluwer;1994. p.137-52.*
38) Rah BJ, Kim HD, Park YW. *Effect of pretreatment with diltiazem on left ventricular function and intracellular calcium distribution in postischemic reperfused guinea-pig hearts. Coronary Artery Dis 1994;5:415-23.*
39) Kim H, Kim DJ, Chung HS, Shim SJ, Ryoo UH, Rah BJ, *et al. Evidence of protein kinase C translocation by ischemic preconditioning in global ischemia model. Korean J Med Sci 1998;13:473-82.*
40) Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. *Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? Circulation 1995;92:1546-77.*
41) Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. *Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig hearts in vivo. Circulation 1994;90(Suppl I): I-647.*