

허혈 심근 Mitochondria의 Superoxide Anion 생성 및 세포손상 기전*

한림대학교 의과대학 내과학교실

임 종 윤 · 이 영

서울대학교 의과대학 약리학교실

이 윤 송 · 김 명 석

= Abstract =

Production of Superoxide Anion and Damage of Mitochondria Isolated from Ischemic Reperfused Heart

Chong-Yun Rim, M.D., Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hallym University

Yun-Song Lee, M.D., Myung-Suk Kim, M.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Background. Oxygen free radicals have been implicated as a cause of deleterious effects in the setting of coronary reperfusion, and they are believed to be generated by the xanthine oxidase system, from activated neutrophils and from mitochondria. We evaluate the contribution of mitochondria to the production of oxygen free radicals and clarify the mechanism of cellular damage in ischemic reperfused hearts.

Methods. Mitochondria isolated from the ischemic rabbit hearts were incubated in the reaction conditions with different oxygen tensions. Generation of superoxide anion and activities of defensive enzymes against oxidative stress were measured.

Results. Superoxide anion generation by mitochondria incubated in 21% oxygen condition were 0.54 ± 0.09 and 0.27 ± 0.04 ($\text{O}_2 \cdot^-/\text{min}/\text{mg}$ protein) in ischemic mitochondria and in control respectively ($P < 0.05$). Activities of defensive enzymes against oxidative stress, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, were significantly reduced in mitochondria isolated from either ischemic or reperfused hearts. With the lapse of respiration in 21% oxygen condition, ADP-stimulated state 3 oxygen consumption (306.4 ± 31.5 vs 214.4 ± 11.4 n atoms O/min/mg protein) at 30 minutes, P : O ratio and phosphorylation rate were significantly decreased in ischemic mitochondria.

Conclusions. Elevation of oxygen free radical generation as well as the reduction of defensive enzyme activities in ischemic reperfused mitochondria are injurious to mitochondrial

*본 논문은 1991년도 서울대학교병원 임상연구비 보조로 이루어졌음.

respiratory function. It may contribute to the mechanism of cellular damage in ischemic reperfused hearts.

KEY WORDS : Superoxide anion · Mitochondria · Reperfused myocardium

서 론

심장의 관상혈류 감소로 발생하는 허혈성 심장병에 있어서 허혈 정도와 그 부위의 크기는 심실의 기능부전 및 사망율과 비례한다(Sobel¹⁾ et al., 1972). 따라서 급성 심근경색환자에 있어서는 streptokinase, prourokinase, tissue-type plasminogen activator 등의 혈전 용해약물을 투여하거나, 관상동맥 우회 이식술, 경피적 관상동맥 성형술 등을 통해 관상혈류를 재개시켜 줌으로써 심근 경색의 크기를 줄이려는 시도를 하고 있다.

그러나 허혈 기간이 오래된 경우에는 이러한 방법으로 재관류를 실시하더라도 심근기능이 반드시 호전되지는 않으며, 경우에 따라서는 오히려 심근손상이 악화되어 병리학적으로 세포팽창, contraction band, 세포막 투과성 증가 등의 미세구조 변화(Hearse^{2,3)} et al., 1975, 1978)와 더불어 심한 심기능 부전이 초래될 수 있다. 이러한 현상을 재관류 손상이라 부르며 임상적으로 허혈성 심장병 뿐 아니라 개심술 및 기타 다른 기관, 조직들의 허혈 병변에서도 문제가 될 수 있다. 호기성 세포가 산소부족에 빠질 때는 각종 대사산물들이 환원상태로 축적될 것이며, 이러한 경우에 산소공급이 급격히 재개된다면 산소의 부분적 환원형인 반응성 산소라디칼(superoxide anion, $O_2 \cdot^-$; hydrogen peroxide, H_2O_2 ; Hydroxyl radical, $OH \cdot$)의 생성이 증가하고 이로 인한 세포손상이 야기될 수 있으리라 추정된다(Meerson⁴⁾ et al., 1982). 임상적인 재관류 손상 역시 허혈병변 부위에 관상혈류가 재개됨으로서 급격한 산소공급이 이루어지는 것과 관련이 있으며, 그에 따른 반응성 산소라디칼의 발생이 심근 손상을 악화시키는 인자의 하나가 될 것으로 보고 되어 있다(Hess⁵⁾ and Manson 1984; Simpson⁶⁾ and Lucchesi 1987). 실험적으로 superoxide dismutase, catalase, α -tocopherol 등의 산소라디칼 제거 효소 및 항산화제가 in vivo 및 in vitro의 재관류 손상 또는 산소 재공급

손상에 보호효과가 있다는 보고(Kim⁷⁾ and Akera 1987; Lee⁸⁾ et al., 1987; Shlafer⁹⁾ et al., 1982)와 electron spin resonance spectroscopy를 이용하여 재관류 심장에서 라디칼의 생성을 측정 한 보고등은(Garlick¹⁰⁾ et al., 1987; Baker¹¹⁾ et al., 1988) 재관류 손상시 유독성 산소라디칼의 관련성을 뒷받침 해주고 있다. 그러나 산소라디칼이 허혈-재관류 심근에서 세포손상기전의 하나로서 중요한 역할을 할 가능성이 많기는 하지만 이러한 산소라디칼의 발생원 및 그 발생 기전에 관하여는 아직도 명확히 밝혀져 있지 못한 점이 많다. 지금까지 in vivo 실험 및 여러 조직에서의 연구를 종합해 보면 어느 한가지 보다는 다양한 기전과 출처로부터 발생될 것으로 여겨지며, 그 가능성이 있는 것으로서 xanthine oxidase, 중성 백혈구, catecholamine 및 mitochondria 등이 거론되고 있다(Chamber¹²⁾ et al., 1985; Simpson⁶⁾ and Lucchesi 1987; Singal¹³⁾ et al., 1982).

Mitochondria는 심근조직에서 산소소모가 가장 많은 세포내 소기구로서 in vivo 실험에서 mitochondria의 호흡에 의하여 소모되는 산소의 약 5% 내외가 단가형으로 환원되어 superoxide anion, hydrogen peroxide 등을 형성한다고 알려져 있다(Boveris¹⁴⁾ and Chance, 1973; Turrens¹⁵⁾ and Boveris, 1980). In vitro에서 추출시간이 경과되어 기능이 저하된 mitochondria, 또는 일정시간의 저산소 상태를 유지하여, mitochondria를 다시 산소공급조건으로 전환시킬 경우 산소라디칼 생성이 증가됨이 보고되었다(Leyck¹⁶⁾ and Parnum 1988; Turrens¹⁷⁾ et al., 1982).

호흡 기능이 저하된 mitochondria에서는 전자 전달물질들이 환원상태로 존재하게 되며 갑작스런 산소재공급이 일어나면 축적된 환원물질들에 의해 산소의 단가형 환원이 쉽게 일어나 산소라디칼이 형성될 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이러한 mitochondria의 라디칼 형성이 in vivo의 허혈-재관류 심장에서의와 같은 상황에서도 세포 손상을 야기할

수 있을 정도로 증가할 지는 연구방법상 세포내 현상을 직접 확인할 수 없다는 점에서 결론을 내지 못하고 있다.

산소라디칼은 지질성분을 비롯하여 DNA, 효소 단백질 등 각종 세포구성물질에 대하여 산화성 변화를 일으키며, 특히 불포화 지방산을 많이 함유한 지질로 구성되어있는 세포막, mitochondria의 내, 외막 등 여러 막성구조물들은 산소라디칼에 의하여 쉽게 산화성 손상을 당한다(Freeman¹⁸⁾ and Crapo 1982 ; Kramer¹⁹⁾ et al., 1984 ; Meerson⁴⁾ et al., 1982). 그러나 mitochondria의 matrix내에는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, GSH 등 산화 반응에 대한 방어기전들이 존재하기 때문에 정상 상태에서는 전자 전달계에서 생긴 산소라디칼이 손상을 입히지는 않는다. 그렇지만 허혈 및 저산소조건에서는 이와 같은 방어기전의 기능이 저하됨이 보고 되었다(Guarnieri²⁰⁾ et al., 1980 ; Schlafer²¹⁾ et al., 1987 ; Kim²²⁾ et al., 1989).

Mitochondria에서 산소라디칼 생성이 증가하거나, 이들에 대한 방어기전이 저하된다면 다른 세포 구성물질 뿐 아니라 mitochondria 자체도 산화성 손상을 당함으로써 전반적인 기능 저하가 초래될 것으로 예상된다. Xanthine-xanthine oxidase system을 이용한 in vitro 산소라디칼 발생조건에서 심근 mitochondria의 호흡기능 및 산화성 인산화가 저하된다는 보고들(Nohl²³⁾ et al., 1978 ; Otani²⁴⁾ et al., 1984)은 이를 뒷받침한다. 이와같은 산소라디칼에 의한 mitochondria의 산화적 인산화 저하는 ATP생성을 억제할 것이며, 허혈심장의 재관류시 심장기능의 회복은 심근수축에 요구되는 충분한 에너지 공급 여하에 달려 있다는 점을 생각한다면 mitochondria에서의 ATP 생성감소는 궁극적으로 비가역적인 심기능 부전으로의 진행을 촉진할 것이다(Jennings²⁵⁾ et al., 1981)

이상에서와 같이 mitochondria는 세포의 내인성 산소라디칼 발생원으로서 재관류 조직손상의 발생에 상당한 역할을 할 가능성은 충분히 있으나 전술한 바와 같이 연구방법상 세포내 현상을 확인하기가 어렵기 때문에 in vitro 재관류 심근 손상에 있어서 mitochondria의 기여도에 관하여는 확실한 결론은 내리지 못하고 있다. 본 연구는 생체의 허혈-재관류와 유사한 상태를 유도하기 위하여

산소분압을 달리한 in vivo 실험 조건에서 허혈심근 mitochondria를 반응시키면서 산소라디칼의 생성 능력과 방어기전, mitochondria 호흡기능 및 산화적 인산화 변화등을 관찰함으로써 허혈-재관류 심근의 세포손상에 있어 mitochondria의 역할을 검토하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

Catalase, superoxide dismutase(SOD), epinephrine bitartrate, adenosine 5'-diphosphate(ADP), antimycin A, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase, t-butyl hydroperoxide는 Sigma(St. Louis, U.S.A.) 제품을 사용하였고 sodium succinate와 기타 일반시약은 Merck (Darmstadt, West Germany) 제품을 사용하였다.

2. 허혈 및 재관류 심근 유도

체중 1~1.5kg의 건강한 New Zealand White계 가토를 실험동물로 사용하였다. Heparin(1000 IU)을 정맥투여하고 sodium pentobarbital 30mg/kg 정맥주사로 마취후 흉부를 절개하여 심장을 즉시 적출하였다. 냉 Krebs-Henseleit(K-H) 용액(mM ; NaCl 118, NaHCO₃ 27.2, KCl 4.8, MgSO₄ · 7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1, CaCl₂ 1.25, glucose 11.1 pH 7.4) 속에서 심낭 및 지방조직을 제거한 후 Langendorff 관류장치에 대동맥을 연결하고 peristaltic pump를 이용하여 28ml/min의 일정한 관류 속도로 역방향의 정량 관상관류를 실시하였다. 관류액은 95% O₂, 5% CO₂로 포화시키고 37.5℃를 유지하였다. 15분간 관류하여 잔류혈액을 세척하고 심박동 및 수축이 일정해진 후 30분동안 카놀라를 막아 global ischemia를 유도시켰다. 허혈시 대기중 산소의 접촉을 피하고 심장의 건조를 방지하기 위하여 95% N₂, 5% CO₂로 포화시키고 glucose 대신 mannitol(11.1mM)로 대체한 37.5℃의 K-H용액에 심장을 담가 두었다. 30분 허혈이 지난 뒤 95% O₂, 5% CO₂를 포화시킨 K-H 용액을 28ml/min로 30분간 다시 관류시켜 줌으로써 재관류를 유도하였다. 대조 심장은 허혈 경과없이 95% O₂, 5% CO₂를 포화시킨 정상 K-H 용액을 15~30분 동안 28

ml/min로 정량 관류하였다.

3. Mitochondria 추출 및 submitochondrial particle 제조

Mitochondria 추출은 alkaline bacterial protease (Nagarse enzyme)를 사용한 differential centrifugation 방법으로 하였다. 요약하면 1.0mg/min의 nagarse enzyme과 1mM EDTA가 포함된 냉 MSH 용액(mM ; Mannitol 210, Sucrose 110, HEPES 5, pH 7.4) 5ml속에 심실근을 넣고 5분간에 걸쳐 잘게 자른 후 glass-teflon homogenizer로 세번에 걸쳐 위, 아래로 갈았다. 약 4배 정도 부피의 냉 MSH 용액을 더 첨가한 후 다시 1분간에 걸쳐 완전히 균질화 하고 700×g에서 10분간 원심분리하여 혈구, 핵, 조직편등을 제거하였다. 상청액을 nylon mesh로 여과한 후 8,000×g, 10분동안 원심분리하여 mitochondria pellet을 얻었다. 그 pellet을 5배 용량의 KEA 용액(mM ; KCl 180, EDTA 10, Tris 10, Bovine albumin, Fraction V 0.5 g%, pH 7.4)에 다시 부유시킨 다음 원심분리하여 세척하였다. 세척은 2회 반복하였으며, 최종 세척 pellet은 2~3ml의 KEA용액에 단백질농도가 10mg/ml이 되도록 부유시켰다. 단백질농도는 bovine serum albumin을 기준으로 하여 Lowry²⁶⁾ 등 (1951)의 방법으로 측정하였고, 모든 조작은 4℃에서 실시하였다.

Submitochondrial particle은 mitochondria를 초음파 분쇄하여 제조하였다. 즉 앞에서 추출한 mitochondria를 40 watt에서 2분 간격으로 각각 10초씩 2번 초음파로 분쇄하였다(Heat systems-ultrasonics, model W 385). 분쇄한 mitochondria에 4배정도 부피의 KEA 완충액을 넣고 140,000×g에서 1시간동안 초원심분리(Beckman model L8-M)를 실시하였다. 상청액은 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase활성도를 측정하기 위하여 -70℃에서 보관하였고, submitochondrial pellet은 1.0mM EDTA가 포함된 MSH 완충액으로 앞에서와 같은 요령으로 두번 세척하였다. 상청액과 pellet의 단백질 농도는 Bradford²⁷⁾(1976)의 방법에 의해 측정하였다.

4. Superoxide anion 생성율의 측정

SOD 억제성인 epinephrine에서 adrenochrome

으로의 산화 반응을 이용하여 측정하였다(Misra²⁸⁾ and Fridovich, 1972). MSH 완충액(mM ; mannitol 210, sucrose 70, HEPES 30, pH 7.4)에 mitochondria 분획 2mg/ml, epinephrine 1mM, catalase 1 μM을 넣고 호흡기질로서는 succinate 10mM을 첨가후 antimycin A 2 μM로 호흡을 억제하여 반응을 시작했다. 반응액은 21% O₂(공기) 또는 100% O₂로 포화시켰다. SOD-억제성인 epinephrine에서 adrenochrome의 산화를 dual-wavelength spectrophotometer(Hitachi model 557)로 485/575 nm($\Delta\epsilon=2,860/M/cm$)에서 측정하였다. Mitochondrial matrix내의 방어기전을 제거한 submitochondrial particle에서의 superoxide anion의 생성율은 mitochondria에서와 같은 조건으로 30℃에서 측정하였으며, 단 submitochondrial particle의 농도는 0.5mg/ml로 하였다.

5. 산소라디칼 방어효소의 활성도 측정

1) Superoxide dismutase(SOD) 활성도

Mitochondria matrix내에서 superoxide anion을 H₂O₂로 dismutation 시키는 SOD의 활성도를 측정하였다. Misra²⁸⁾와 Fridovich(1972)의 방법에 의하여 초음파 분쇄 mitochondria의 상청액에서 활성을 측정하였다. 0.1mM EDTA가 포함된 pH 10.2의 0.05 M NaHCO₃-Na₂CO₃ 완충액에서 0.12 mM epinephrine이 adrenochrome으로 자가산화되는 반응이 matrix 분획(20~80 μg/ml)에 의하여 억제되는 정도를 325nm에서 spectrophotometer(Hewlett Packard model 8452 A)로 측정하였다. 측정은 30℃에서 실시하였으며 epinephrine의 자가산화율을 50% 억제하는 활성도를 1 unit로 하여 units/mg protein으로 계산하였다.

2) Glutathione peroxidase(GSH Px) 활성도 측정

GSH Px의 활성도는 Gunzler²⁹⁾ 등(1974)의 방법에 의해 측정하였다. 0.5mM EDTA가 포함된 pH 7.0의 50mM potassium phosphate buffer에 0.16 mM NADPH, 2mM GSH, 1 U/ml GSH reductase, 0.6mM t-butylhydroperoxide(t-BOOH)와 matrix 분획(20~80 μg/ml)을 넣은 상태에서 NADPH가 감소되는 것을 340nm에서 spectrophotometer(Hewlett Packard model 8452A)를 사용하여 측정하였다. 측정은 37℃에서 실시하였으며 기질인

t-BOOH를 넣은 후의 흡광도 변화율에서 t-BOOH을 넣기전의 흡광도를 뺀 수치를 GSH Px에 의한 반응으로 간주하였다. GSH Px의 활성도는 0.5 μ M의 NADPH를 1분동안에 NADP로 변화시키는 능력을 1 unit로 하여 mU GSH Px/mg protein으로 계산하였다.

6. Mitochondria의 호흡 기능 및 산화적 인산화 측정

Mitochondria의 산소라디칼 생성을 측정함과 동시에 생성된 산소라디칼에 의한 mitochondria 기능손상의 척도로 호흡 및 산화적 인산화의 변화를 Clark-type oxygen electrode를 사용한 biological oxygen monitor(Yellow Spring Instrument, Model 5300)를 이용하여 측정하였다. 0.1mM EDTA가 포함된 MSH 완충액에 0.5mg/ml의 mitochondria 분획과 5mM K₂HPO₄를 넣고 succinate 10mM을 기질로 하여 state 4 호흡을 시작하였고, in vivo의 허혈-재관류 과정과 유사한 상황을 유도하기 위하여 21% O₂ 또는 100% O₂ 조건에서 succinate로 state 4호흡을 시작한 후 0, 15, 30분에 ADP 150 μ M을 첨가하여 state 3의 호흡을 유도하고 각 state에서의 산소소모율(QO₂)을 측정하였다. 산화적 인산화의 지표인 phosphorylation rate는 첨가한 ADP와 이를 인산화 시키기 위하여 소비한 산소의 비율(P : O ratio)에 QO₂를 곱하여 계산하였다.

결 과

1. Superoxide anion 생성

95% O₂, 5% CO₂를 포화시킨 정상 K-H 용액을 15분간 관류시킨 대조 심장의 mitochondria는 21% O₂ 조건에서 superoxide anion 생성율이 0.27n moles/min/mg protein을 보인 반면, 30분간 global ischemia를 유발시킨 심장의 mitochondria는 같은 산소분압 조건에서 0.54n moles/min/mg protein의 생성율은 보여 대조군의 비해 유의한 증가를 나타내었다(Table 1, Fig. 1). 한편 100% O₂로 포화시켜 산소분압을 높임으로써 superoxide anion의 생성능력을 증대시킨 조건에서는 대조군에서 0.59n moles/min/mg protein, 허혈군에서는 0.64n moles/min/mg protein로 superoxide anion 생성

Table 1. Formation of superoxide anion by mitochondria and submitochondrial particles isolated from rabbit hearts¹⁾

Condition	Superoxide anion (O ₂ · /min/mg protein)	
	Control ²	Ischemia ²
Mitochondria		
21% O ₂	0.27 ± 0.04	0.54 ± 0.09*
100% O ₂	0.59 ± 0.06	0.64 ± 0.10
Submitochondrial Particles		
21% O ₂	0.95 ± 0.20	0.88 ± 0.05
100% O ₂	1.66 ± 0.22	2.12 ± 0.14*

1 : Superoxide anion formation was estimated by the method as same as in Fig. 1. and 3.

2 : Mean ± SEM of 6-4 experiments

* : P < 0.05 vs control

율이 허혈 mitochondria에서 약간 증가하는 양상을 보이거나 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 1, Fig. 1).

Submitochondrial particle의 superoxide anion 생성율은 온전한 mitochondria에 비하여 약 2~3배 높았다(Table 1). 21% O₂ 조건에서 대조군 0.95n moles/min/mg, 허혈군 0.88n moles/min/mg로 생성율에 유의한 차이가 없는 반면 산소분압을 높인 100% O₂ 조건에서는 대조군 1.66n moles/min/mg protein에 비해 허혈군에서는 2.12n moles/min/mg protein으로 유의한 증가를 보였다(Table 1, Fig. 3).

2. Mitochondria의 산소라디칼 방어효소

Mitochondria 내에서 생성된 superoxide anion을 dismutation 시켜 H₂O₂와 O₂ 바꾸어주는 superoxide dismutase(SOD)와 H₂O₂를 분해하는 효소인 glutathione peroxidase(GSH Px)의 활성도를 측정하였다.

SOD의 활성도는 30분간 global ischemia를 유발시킨 심근에서 대조군(12.0 U/mg protein)에 비해 별 차이를 보이지 않았지만 허혈-재관류 심근 mitochondria에서의 활성도는 5.3 U/mg protein으로 현저한 감소를 보여주었다(Fig. 4). 한편 GSH Px의 활성도는 대조군(257.7 mU/mg protein)에 비해 허혈 심근 mitochondria(170.8 mU/mg protein)에서도 감소를 보이며 이는 재관류시 64.5

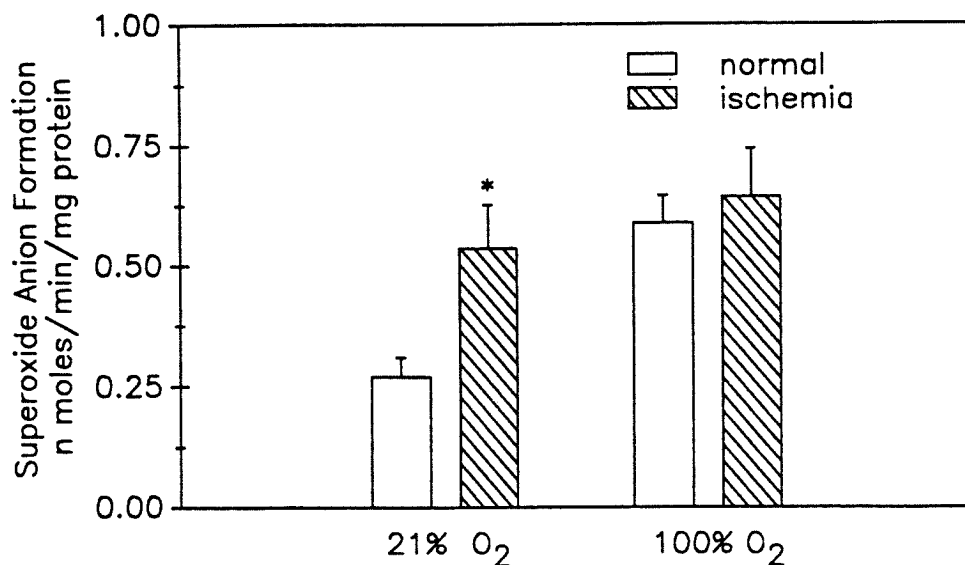


Fig. 1. Formation of superoxide anion by mitochondria isolated from rabbit hearts.

Superoxide anion production was estimated by measuring SOD-inhibitable adrenochrome formation from epinephrine. The superoxide anion-induced formation of adrenochrome was followed at 485-575nm in a dual-wavelength spectrophotometer, and was confirmed by inhibition of the reaction by SOD(0.3uM). Intact mitochondria were isolated from normal control(open bar) and 30min-ischemic(hatched bar) hearts. Mitochondria(2mg/ml) were suspended in 2ml reaction medium(mannitol 210mM, sucrose 70mM, HEPES 30mM, pH 7.4) saturated with either 21 % O₂(air) or 100 % O₂ at 30°C.

Other additions were epinephrine 1mM, succinate 10mM, catalase 1uM and antimycin A 2 uM. The reaction was started by addition of antimycin A. The values are Means± SEM of 6 experiments.

* : P<0.05 vs normal control.

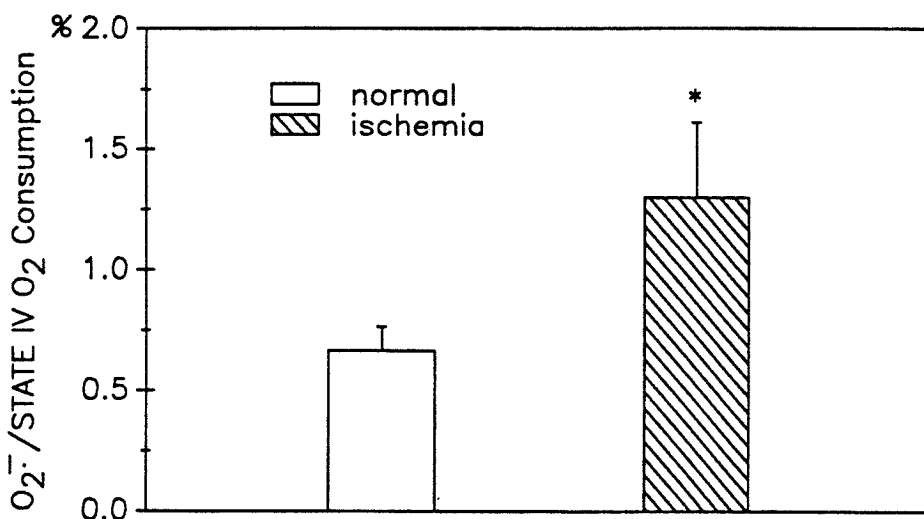


Fig. 2. Ratio between superoxide anion formed and oxygen consumed during state 4 respiration in intact mitochondria.

Formation of superoxide anion was estimated in 21% O₂-saturated condition. State 4, succinate-supported oxygen consumption was measured as same as in Fig. 6. Values are Means± SEM of 6-7 experiments. * : P<0.05 vs normal control.

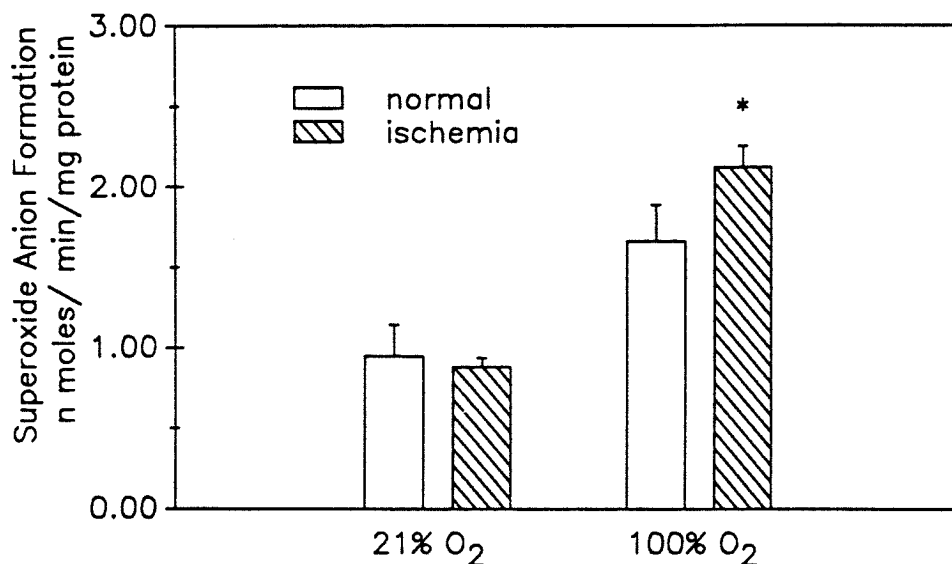


Fig. 3. Formation of superoxide anion by submitochondrial particles of rabbit hearts.

Submitochondrial particles were prepared by ultra-sonication of intact mitochondria isolated from normal control(open bar) and 30min-ischemic(hatched bar) hearts. Sonication was carried out for 20 sec(10 sec \times 2, 2 min interval) at 40W. Submitochondrial particles(0.5mg/ml) were suspended in 2ml reaction medium saturated with either 21 % O₂ or 100 % O₂. Other conditions for measuring superoxide anion production were as same as in Fig. 1. Values are Means \pm SEM of 6 experiments.

* : P<0.05 vs normal control.

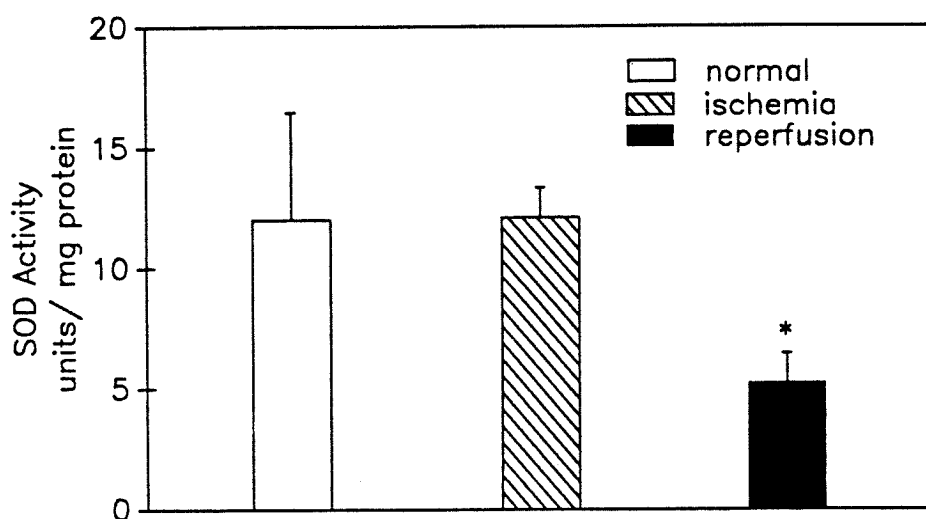


Fig. 4. Activity of superoxide dismutase(SOD) in mitochondria of rabbit hearts. Mitochondria were isolated from normal control(open bar), 30min-ischemic(hatched bar), and ischemic/reperfused(30min, black bar) hearts. Mitochondrial matrix fraction was obtained by ultracentrifugation of sonicated preparations of intact mitochondria. SOD activity was estimated by measuring the extent of inhibition of epinephrine autooxidation as described in the Method. Values are Means \pm SEM of 6 experiments.

* : P<0.05 vs normal control.

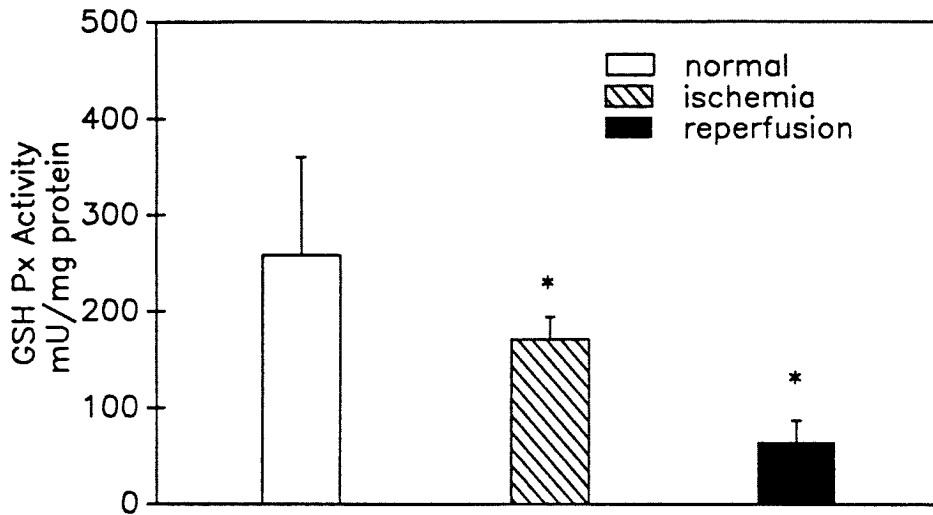


Fig. 5. Activity of glutathione peroxidase(GSH Px) in mitochondria of rabbit hearts.

Mitochondria were isolated from normal control(open bar), 30min-ischemic(hatched bar), and ischemic/reperfused(30 min/30 min, black bar) hearts. Mitochondrial matrix fraction was obtained by ultracentrifugation of sonicated preparations of intact mitochondria. GSH Px activity was measured by UV-Spectrophotometric method using t-butyl hydroperoxide as a substrate. Values are Means \pm SEM of 6 experiments. *: $P<0.05$ vs normal control.

mU/mg protein로 더욱 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 5).

3. Mitochondria의 호흡 및 산화적 인산화

Succinate를 기질로 한 mitochondria의 state 4 호흡시 산소소모량은 정상 대조군(85.1 n atom O/min/mg)이나 허혈군(91.9 n atom O/min/mg)이나 차이가 없었다. 한편 21% O_2 조건에서 state 4호흡을 지속시킬 경우 시간 경과에 따라 산소소모율이 증가하는 양상을 보이지만 두군간에 있어서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 6). ADP 150 μ M을 첨가하여 자극시킨 state 3호흡의 산소소모량(QO_2)은 21% O_2 조건에서 호흡이 지속됨에 따라 정상대조군의 경우 0분, 15분에 365.8 n atoms O/min/mg protein, 385.9 n atoms O/min/mg protein으로 별 변화를 보이지 않지만, 30분에서는 306.4 n atoms O/min/mg protein으로 유의한 감소($P<0.05$)를 보여주었다. 한편 허혈군에서는 0분 291.9 n atoms O/min/mg protein에 비해 같은 산소분압에서 호흡이 지속됨에 따라 15분에서 274.1 n atoms O/min/mg protein로 감소하고, 30분에서는 214.4 n atoms O/min protein로 더욱 감소하였으며 각 시간대에서 허혈군의 QO_2 는 대조

군의 QO_2 에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 7). 각 군에서 0분의 QO_2 를 100%로 하여 15분, 30분에서의 QO_2 를 백분율로 표시하였을 때 시간에 따른 QO_2 의 감소는 대조군보다 허혈성 mitochondria에서 더욱 현저 하였다(Fig. 8).

첨가한 일정량의 ADP를 APT로 인산화 시키는데 소모한 산소의 양과 인산화된 ADP의 비율인 P : O ratio는 인산화되는 자리(phosphorylation site)의 갯수를 나타내주는 지표로서 산화 인산화 연결이 완벽한 mitochondria에 있어서 succinate를 기질로 하였을 경우에 이론적으로는 2가 된다. 본 실험에서는 대조와 허혈 심근 mitochondria에서 각각 1.75, 1.63이던 것이 21% O_2 조건으로 호흡을 지속시킴에 따라 대조군에서는 15, 30분에 각각 1.64, 1.47로 약간 감소하는 경향을 보였으며, 한편 허혈 mitochondria에서는 역시 같은 조건에서 각각 1.31, 1.10으로 더욱 감소하는 추세를 보였다(Table 2). Mitochondria의 산화적 인산화 능력을 나타내주는 지표로서 인산화율(phosphorylation rate = $QO_2 \times P : O$ ratio)을 앞의 자료로부터 계산하였다. 대조 mitochondria의 인산화율은 0.64 μ moles ATP/min/mg protein이었으며, 호흡이 지속됨에 따라 15분에서는 별 차이를 보이지 않았

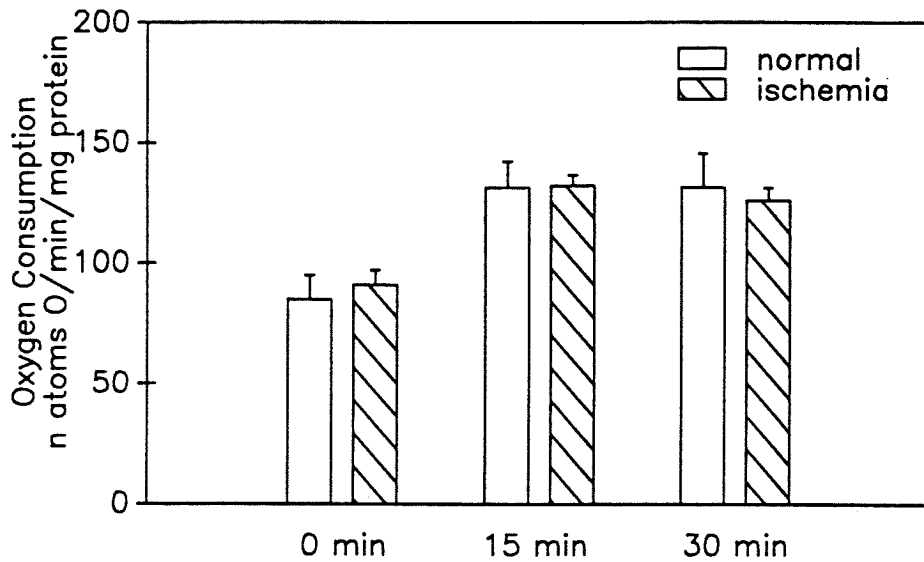


Fig. 6. State 4 oxygen consumption by mitochondria isolated from ischemic hearts.

Succinate-supported, state 4 oxygen consumption was determined at 0, 15 and 30 min after addition of succinate(10 mM) by the polarographic method using Clark-type oxygen electrode. Mitochondria (0.5mg/ml) were suspended in MSH medium(mM : Mannitol 210, Sucrose 70, HEPES 30, EDTA 0.1, pH 7.4) saturated with 21% O₂(air at 30°C).

Value are Means \pm SEM of 6-7 experiments.

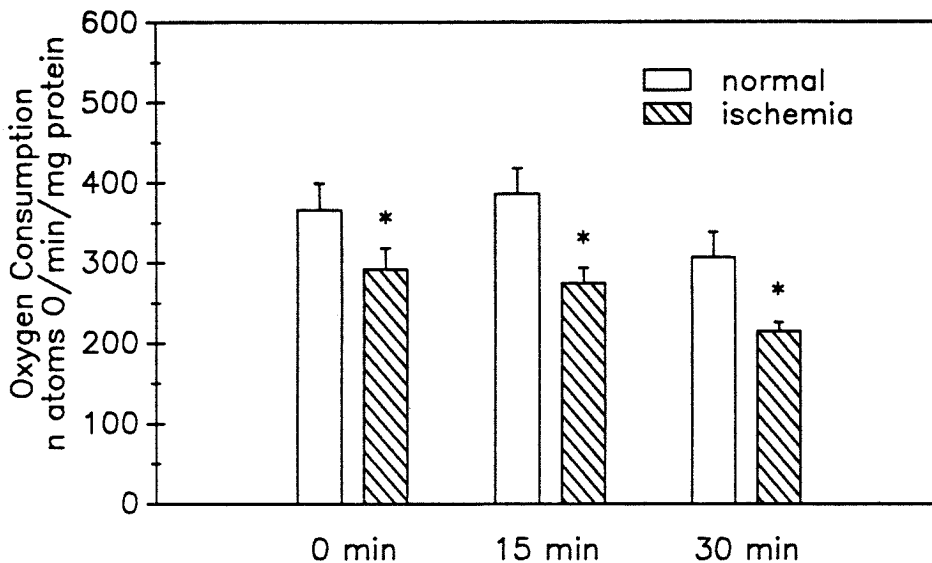


Fig. 7. State 3 oxygen consumption by mitochondria isolated from ischemic hearts.

ADP-stimulated, state 3 oxygen consumption(QO₂) was determined at 0, 15 and 30 min after addition of ADP(150uM) by the polarographic method using Clark-type oxygen electrode. Mitochondria(0.5 mg/ml) were suspended in MSH medium containing 10mM succinate, 0.1mM EDTA, 5mM K₂HPO₄, which was saturated with 21% O₂ at 30°C. Values are Mean \pm SEM of 6-7 experiments.

* : P<0.05 vs normal control.

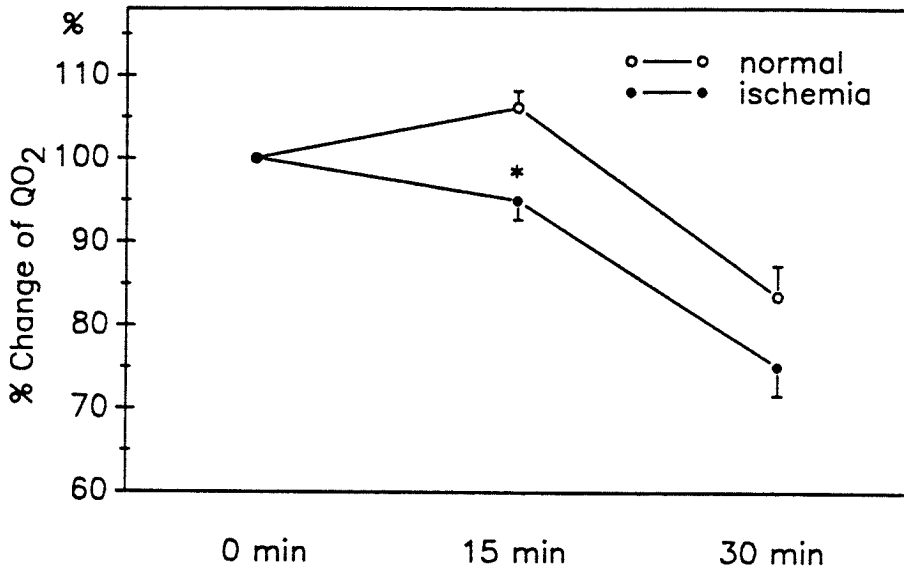


Fig. 8. Change of state 3 oxygen consumption(QO_2) in cardiac mitochondria respired for different time intervals.

Plot were redrawn from the results in Fig. 7. *: $P < 0.05$ vs normal control at the corresponding time.

Table 2. Respiration and oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria respired for different time intervals¹

	Time (min)	Control	Ischemic
State 4 ² respiration	0	85.1 ± 9.9	91.9 ± 6.0
	15	131.1 ± 11.1	132.1 ± 4.4
	30	131.3 ± 14.2	125.7 ± 5.4
State 3 ² respiration	0	365.8 ± 33.2	291.9 ± 26.2 *
	15	385.9 ± 31.8	274.1 ± 19.5 *
	30	306.4 ± 31.5	214.4 ± 11.4 *
P : O ratio	0	1.75 ± 0.10	1.63 ± 0.04 *
	15	0.64 ± 0.07	1.31 ± 0.03 *
	30	1.47 ± 0.06	1.10 ± 0.02 *
PR ³	0	0.64 ± 0.08	0.47 ± 0.04 *
	15	0.63 ± 0.06	0.36 ± 0.03 *
	30	0.44 ± 0.04	0.24 ± 0.02 *

Values are Means ± SEM of 6-7 experiments.

1 : Mitochondria isolated from normal control and ischemic hearts were respired with succinate in 21% O_2 (air) conditions.

2 : n atoms $O/min/mg$ protein

3 : Phosphorylation rate = $QO_2 \times P : O$ ratio, μ moles ATP/min/mg protein

* $P < 0.05$ vs control

으나 30분에서는 $0.44 \mu\text{moles ATP/min/mg protein}$ 으로 감소하였다. 한편 허혈 mitochondria의 인산화율은 $0.47 \mu\text{moles ATP/min/mg protein}$ 으로 대조에 비하여 낮았으며, 이는 21% O_2 조건에서 호흡시간이 경과함에 따라 더욱 감소하여 15분, 30분에 각각 0.36 , $0.24 \mu\text{moles ATP/min/mg protein}$ 을 보였다(Fig. 9, Table 2). 각 군에서 호흡 시작시 인산화율에 대하여 15분과 30분에서의 인산화율을 백분율로 나타내었을 때 대조군에 비해 허혈군에서 호흡지속시간이 경과함에 따라 유의한 차이를 보이며 감소하였다(Fig. 10).

고 안

In vitro에서 mitochondria호흡시 산소라디칼이 생성될 뿐 아니라, 호흡기능이 억제된 mitochondria에서 산소라디칼 생성능력이 오히려 증가된다는 보고들(Boveris¹⁴) and Chance 1973 ; Lyeck¹⁶) and Parnum 1988 ; Turrens¹⁷) et al., 1982)은 mitochondria도 산소라디칼 발생원인의 하나가 될 수 있음을 제시하는 것으로 여겨진다. Otani²⁴)등 (1984)은 허혈심근 mitochondria의 state 4 호흡시

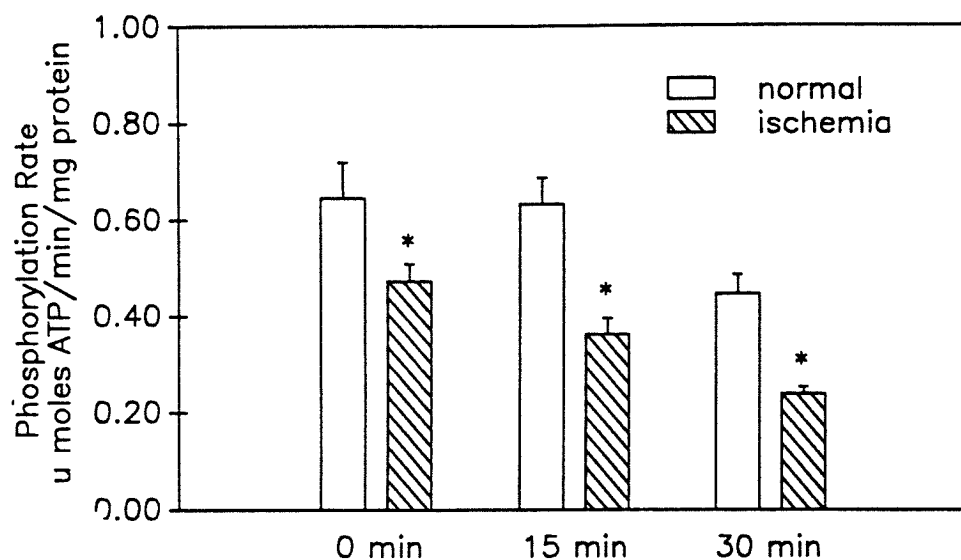


Fig. 9. Phosphorylation rate with succinate in mitochondria isolated from ischemic hearts. Phosphorylation rate was calculated from the product of P:O ratio and QO_2 . Values and Means \pm SEM of 6-7 experiments. *: $P < 0.05$ vs normal control.

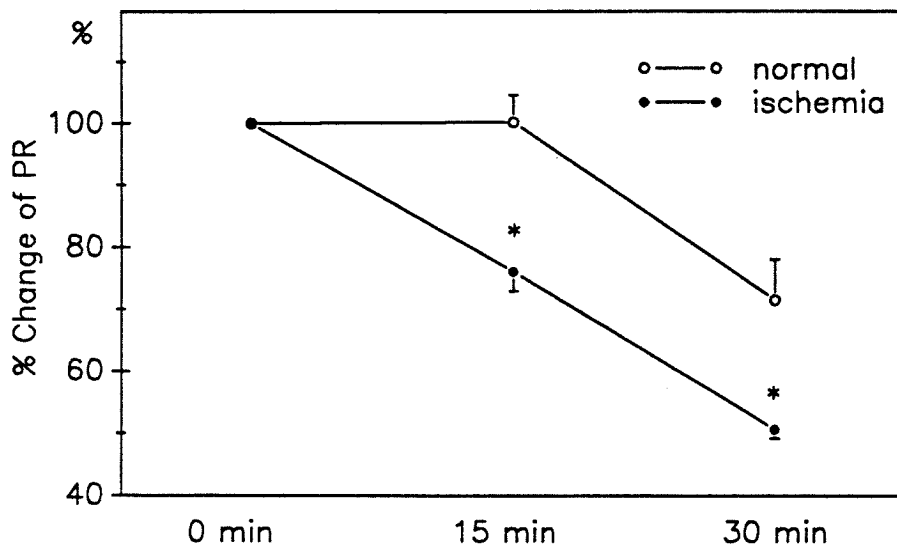


Fig. 10. Changes of phosphorylation rate (PR) in cardiac mitochondria respired for different time intervals with succinate and ADP. Plot was redrawn from the results in Fig. 9. *: $P < 0.05$ vs normal control at the corresponding time.

산소 stress를 가할 경우 hydroxyl radical 생성이 증가함을 electron spin resonance spectroscopy를 이용하여 관찰한 바가 있으며, 본 연구 결과에서도 반응액의 산소분압을 높인 조건에서 mitochondria의 superoxide anion 생성이 증가할 뿐 아니라,

대조군에 비하여 허혈 mitochondria에서 생성율이 더 높다는 것은 심근세포의 내인성 산소라디칼 발생원으로서 mitochondria의 가능성을 뒷받침하는 결과로 판단된다.

그러나 생체의 허혈후 재관류 심근에서도 mito-

chondria가 이러한 산소라디칼의 발생원으로서 심근세포손상에 관여할 수 있을지는 아직도 명확히 확인된 바가 없다. 본 연구에서는 21% O_2 또는 100% O_2 로 산소분압을 달리한 조건에서 허혈심근 mitochondria를 반응시킴으로써 in vivo의 허혈-재관류시와 유사한 상태를 유도하고자 하였다. 생체에서 동맥혈 및 모세관혈의 산소농도가 각각 약 160 μM , 48 μM 이고, 정상심근의 관상 모세관 혈액의 산소농도는 32 μM 정도(Heineman and Balaban 1990)라는 점을 감안한다면 본 연구에서 채택한 100% O_2 는 물론이고 공기중 산소에 해당하는 21% O_2 로 포화된 반응액 중의 산소농도 (223 μM)도 생체에서 허혈 후 재관류시 급격히 공급되는 산소량을 충분히 상회할 것으로 생각된다. mitochondria에서 산소라디칼의 발생은 내막의 전자전달계를 통한 전자의 흐름 과정에서 일어나며, matrix내에는 발생된 산소라디칼을 제거하는 기전들이 존재한다. 연구성적에서처럼 허혈 심근 mitochondria에서 산소라디칼 생성이 증가한다는 것은 내막의 전자전달계에서 산소라디칼 발생 자체가 실제로 증가했기 때문일 수도 있고, 한편으로는 생성은 증가하지 않았더라도 산소라디칼 제거기전이 변화된 결과로서 생성이 증가한 것처럼 보일 수도 있다. 심근 조직에서 허혈시 산소라디칼 방어기전들이 저하된다는 보고(Guarnieri²⁰) et al., 1980 ; Shlafer²¹) et al., 1987) 및 본 연구에서 superoxide anion 및 H_2O_2 를 제거하는 효소인 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase의 활성도가 대조군에서보다 허혈 및 재관류 mitochondria에서 저하되어 있다는 것은 후자의 가능성을 배제할 수 없게하는 바로 여겨진다. 그러나 matrix 분획을 제거함으로써 방어기전들을 배제한 sub-mitochondrial particle에서의 superoxide anion 생성이 또한 허혈 mitochondria에서 더 높았다. 특히 100% O_2 로 산소분압을 높임으로서 산소라디칼 생성능력을 최대한으로 증대되도록 한 조건에서 허혈심근 submitochondrial particle의 superoxide anion 생성이 대조군보다 유의하게 높았다는 것은 mitochondria의 산소라디칼 생성능력 자체가 일차적으로 증가함을 나타내는 결과라고 사료된다. 한편 본 연구 방법에서와 같이 mitochondria의 내부에서 생성된 superoxide anion을 외부에서

측정하는 경우에는 mitochondria 막을 통한 superoxide anion의 투과성도 실험 결과에 영향을 미칠 수 있을 것으로 보인다. 허혈 및 재관류 심근에서 조직손상의 일환으로 세포막을 위시하여 mitochondria 내·외막도 비특이적으로 투과성이 증가한다는 사실(Hearse³¹) et al., 1973 ; Crompton³²) 1988)은 본 연구의 허혈 mitochondria에서도 superoxide anion에 대한 투과성의 증가가 있을 수도 있음을 추측케 한다. 즉 state 4 호흡시 산소 소모량은 대조와 허혈 mitochondria에서 차이를 나타내지 않음(Fig. 6)에도 불구하고 이에 대한 superoxide anion의 비율은 허혈 mitochondria가 대조군에서 보다 높은 결과를 보인것은(Fig. 2) 그러한 가능성을 배제할 수 없게 한다.

허혈 mitochondria에 산소 공급시 라디칼 생성이 증가하는 기전에 관하여는 아직도 명확한 설명이 없다. In vivo 실험에서 mitochondria의 전자 전달 체계 중 NADH-CoQ, CoQ-cytochrome b 단계에서 전자 전달을 각각 억제하는 rotenone과 antimycin A가 superoxide anion 생성을 증가시킨다는 사실은 (Boveris¹⁴) and Chance 1973 ; Turrens¹⁵) and Boveris 1980) 산소 분자가 궁극적으로 4개의 전자를 받아 물로 환원 되기 이전에 전자의 누수현상으로 부분적으로 환원되는 산소가 생길 가능성이 많다. 허혈상태에서 mitochondria 호흡이 저하된다는 것은 단순한 산소부족만이 아니고 전반적인 전자전달의 억제를 의미하는 것이기 때문에 산소재공급과 더불어 부분 환원된 라디칼 형태의 산소대사물이 증가할 수 있으리라 여겨진다.

허혈심근 mitochondria는 호흡기능 저하와 더불어 산화-인산화 연결 또한 억제되고 ATP 생성이 감소한다. 이러한 mitochondria의 산화적 인산화 기능 저하는 허혈세포에서 공통적으로 보이는 칼슘농도가 과다하게 높아진 경우 mitochondria의 호흡에 의하여 발생된 energy의 대부분은 산화-인산화 연결에 의하여 ATP를 생성하는데 사용되기 보다는 energy-의존적으로 칼슘을 uptake하는데 소모하기 때문일 것으로 보인다(Hearse³³ 1977). 이와더불어 mitochondria의 과다한 칼슘축적은 칼슘의존적인 각종 분해효소들을 활성화 시킴으로써 mitochondria 내막의 투과성을 비특이적으로 증가시키기 때문에 matrix내의 각종이온, adenine

nucleotide 및 기타 저분자량 물질들을 소실시킨다고 알려져 있다(Crompton³²⁾ 1988). 이러한 칼슘축적에 따른 내막의 변화는 결과적으로 산화적 인산화를 포함한 mitochondria 기능의 전반적인 저하를 가져올 것으로 주장되고 있다. 한편 이외에도 mitochondria는 반응성 산소라디칼에 의하여 직접적으로 손상을 당하므로 전반적인 기능저하가 초래될 가능성이 또한 있다. 산소라디칼은 불포화 지방산을 많이 함유하는 세포의 지질성분을 쉽게 과산화 하기 때문에 mitochondria의 내·외막도 산소라디칼에 의한 산화성 손상의 좋은 표적이 된다(Freeman¹⁸⁾ and Crapo 1982 ; Kramer¹⁹⁾ et al., 1984 ; Meerson⁴⁾ et al., 1982). 21% O₂ 조건에서 호흡을 지속시킬 경우 호흡시간이 경과할수록 인산화율이 저하되었으며 이러한 인산화율의 감소는 특히 허혈 mitochondria에서 더욱 현저하였다. 이는 21% O₂ 조건에서 반응시 superoxide anion 생성이 허혈 mitochondria에서 더 높았고, 또한 허혈 mitochondria에는 산소라디칼에 대한 방어기전이 저하되어 있는 것으로 볼 때 반응성 산소라디칼에 의한 산화-인산화 연결의 억제를 의미하는 것으로 여겨졌으며, 특히 본연구의 반응조건에는 칼슘이 존재하지 않는다는 사실로 볼 때에도 허혈-재관류 mitochondria에서의 기능저하는 칼슘이외에 산소라디칼 등에 의하여도 초래될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경. 허혈 심근에서 재관류 손상의 한 기전으로서 반응성 산소라디칼이 거론되고 있으며, 반응성 산소라디칼은 xanthine oxidase system, 활성화된 중성구 혹은 mitochondria에서 생성되는 것으로 여겨지고 있다. Mitochondria가 반응성 산소라디칼의 생성지인가의 여부와, 이렇게 생성된 반응성 산소라디칼에 의한 세포손상 기전을 밝히고자 했다.

방법. 실험적으로 유발시킨 허혈 가토 심근의 mitochondria에 분압을 달리하여 산소를 재공급함으로써 재관류심근 mitochondria와 유사한 in vitro조건을 만들었으며, 각 실험 조건에서 mito-

chondria의 superoxide anion 생성, 그에 대한 방어기전의 변화 및 mitochondria의 호흡과 산화성 인산화 능력의 변화를 측정하였다.

결과. 21% 산소 조건하에서 허혈심근 mitochondria와 대조군에서의 superoxide anion생성은 각각 0.54 ± 0.09 와 0.27 ± 0.04 (O₂ · min/mg protein)로 허혈 심근에서 유의하게 증가하였으며, 허혈 재관류 심근에서의 superoxide dismutase의 활성도는 $5.3 \mu\text{g/mg protein}$ 으로 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며, glutathione peroxidase의 활성도는 허혈 심근 및 재관류 심근 mitochondria에서 대조군에 비해 모두 유의한 감소를 보였다(각각 170.8과 64.5mU/mg protein). Succinate를 기질로 한 제4기 산소 소모량은 21% 산소 조건에서 호흡경과에 따라 대조군 및 허혈 mitochondria의 양자간에 차이가 없었으며, ADP-촉진 제 3기 호흡의 산소 소모량, P : O ratio 그리고 인산화율은 21% 산소 조건에서 호흡 경과에 따라 허혈 mitochondria에서 대조군보다 현저히 감소하였다.

결론. 이상의 결과로부터 허혈심근의 산소재공급 mitochondria에서 반응성 산소라디칼의 생성 증가, 그에 대한 방어기전의 저하는 mitochondria의 호흡기능, 산화성 인산화 기능을 저하시킴으로써 허혈-재관류시 심근세포 손상의 발생에 일부 기여할 것으로 사료된다.

References

- 1) Sobel B, Bresnahan G, Shell W, Yoder R : *EsHimation of infarct size in man and its relation to prognosis. Circulation* 46 : 640, 1972
- 2) Hearse DJ, Humphrey SM, Nayler WG, Slade A, Bordu D : *Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium. J Mol Cell Cardiol* 7 : 315, 1975
- 3) Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR : *The oxygen paradox and the calcium paradox : two facets of the same problem ? J Mol Cell Cardiol* 10 : 641, 1978
- 4) Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YD, Belkina LM, Arkhipenko YV : *The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. Basic Res Cardiol* 77 : 465, 1982

- 5) 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 ischemic reperfusion injury.* *J Mol Cell Cardiol* 16 : 969, 1984
- 6) Simpson PJ and Lucchesi BR : *Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury.* *J Lab Clin Med* 110 : 13, 1987
- 7) Kim MS, Akera T : *O₂ free radicals : cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K AT-Pase.* *Am J Physiol* 252 : H252, 1987
- 8) 이상동 · 최철희 · 박종완 · 김용식 · 김명석 : 저산소 심장의 oxygen paradox 시 산소 대사물의 역할. *서울의대 학술지* 28 : 181, 1987
- 9) Shlafer M, Kane PF, Wiggin VY, Kirsh MM : *Possible role of cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury.* *Circulation* 66 : 185, 1982
- 10) Garlick pp, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF : *Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy.* *Circ Res* 61 : 57, 1987
- 11) Baker JE, Felix CC, Olinger GN, Kalyanaraman B : *Myocardial ischemia and reperfusion : Direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy.* *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 2786, 1988
- 12) Chamber DE, Park DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM : *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia.* *J Mol Cell Cardiol* 17 : 145, 1985
- 13) Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS : *Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy.* *Can J Physiol Pharmacol* 60 : 1390, 1982
- 14) Boveris A, Chance B : *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* *Biochem J* 134 : 707, 1973
- 15) Turrens JF, Boveris A : *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.* *Biochem J* 191 : 421, 1980
- 16) Leyck S, Parnham MJ : *The cellular origin of oxygen free radical species. Documentation of International Conference on Oxygen Free Radicals in Health and Disease, London. 1988*
- 17) Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JP : *The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles.* *Arch Biochem Biophys* 217 : 401, 1982
- 18) Freeman BA, Crapo JD : *Free radicals and tissue injury.* *Lab Invest* 47 : 412, 1982
- 19) Kramer JH, Mak IT, Weglicki WB : *Differential sensitivity of canine cardiac sarcolemmal and microsomal enzyme to inhibition by free radical-induced lipid peroxidation.* *Cir Res* 55 : 120, 1984
- 20) Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM : *Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart.* *J Mol Cell Cardiol* 12 : 797, 1980
- 21) 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, 1987
- 22) 김명석 · 박종완 · 김용식 · 정명희 · 이동근 : 허혈심근 재관류 손상에 관한 연구 : 환취심근분리 세포의 저산소-산소재공급 손상에 있어서 산소 라디칼의 역할. *서울의대 학술지* 30 : 231, 1989
- 23) Nohl H, Breuninger V, Hegner D : *Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration.* *Eur J Biochem* 90 : 385, 1978
- 24) Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto R, Omoto K, Tanaka K, Sato K, 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, 1984
- 25) Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE : *Total ischemia in dog hearts, in vitro. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo.* *Cir Res* 49 : 892, 1981
- 26) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with Folin phenol reagent.* *J Biol Chem* 193 : 265, 1951
- 27) Bradford MM : *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.* *Anal Biochem* 72 : 248, 1976
- 28) Misra HP, Fridovich I : *The role of superoxide anion in the dismutase.* *J Biol Chem* 247 : 3170, 1972
- 29) Gunzler WA, Kramers H, Flohe' L : *An improved*

- coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. Z Klin Chem Klin Biochem 12 : 444, 1974*
- 30) Heineman FW, Balaban RS : *Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. Annu Rev Physiol 52 : 523, 1990*
 - 31) Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB : *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart : a study of myocardial enzyme release. J Mol Cell Cardiol 7 : 315, 1973*
 - 32) Crompton M : *The effect of ruthenium red and other agents on mitochondrial calcium metabolism. Handbook of Experimental Pharmacology. Calcium in Drug Actions. Vol 83. Springer Verlag, Berlin, 1988, p185.*
 - 33) Hearse DJ : *Reperfusion of ischemic myocardium. J Mol Cell Cardiol 9 : 609, 1977*