

# 

경상대학교 의과대학 생리학교실

강다원 · 이홍식 · 홍성근 · 한재희

## Modulation of Muscarinic K<sup>+</sup> Channel by Protein Kinase C in Ischemic Rat Atrial Myocytes

Dawon Kang, PhD, Hong-Sik Lee, MD, PhD, Seong-Geun Hong, PhD and Jaehee Han, MD, PhD

Department of Physiology, Institute of Health Science, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives :** Recent studies have shown that many kinds of K<sup>+</sup> channels, including the muscarinic K<sup>+</sup> channel (K<sub>ACH</sub>), are activated in the ischemic heart. It is known that these channels can be modulated by phosphorylation. However, little is known about the function of the K<sub>ACH</sub> in ischemic hearts. In this study, we examined whether the K<sub>ACH</sub> channel is mediated by protein kinase C (PKC) activation in rat atrial myocytes under ischemic conditions. **Materials and Methods :** Single atrial cells of adult rat heart were prepared by collagenase digestion. Channel activity of K<sub>ACH</sub> was recorded by cell-attached configuration from single atrial cells under ischemic conditions, using a patch clamp technique. To simulate ischemia, adenosine or potassium cyanide (KCN) was applied to atrial myocytes, and Western blot was performed to specify PKC isoforms. **Results :** Adenosine and KCN markedly increased K<sub>ACH</sub> channel activity. The responses to adenosine and KCN were increased 3-fold at mean open time from that observed with control. Channel activity of K<sub>ACH</sub> was blocked by pretreatment with PKC antagonists such as sphingosine, Gö 6976, and rottlerin. PKC  $\alpha$  and PKC  $\beta^1$  isoform levels were increased in the membrane fraction of ischemic heart, indicating that ischemic stress might trigger translocation of cytosolic PKC to the cell membrane. **Conclusion :** These results show that K<sub>ACH</sub> channels are modulated by PKC activation under ischemic conditions induced by adenosine or KCN. Therefore, the channels can protect the heart from ischemic stress by increasing channel activity. (Korean Circulation J 2005;35:812-820)

**KEY WORDS :** Ischemia ; Adenosine ; Potassium cyanide ; GIRK ; Protein kinase C.

## 서론

허혈성 심장병은 최근 많이 증가하고 있는 심장 질환의 하나로 그 기전과 치료방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 허혈성 심장병 중 심근 경색은 관상동맥 혈류 차단으로 인한 지속적인 심근 허혈에 의해 유발된다. 이러한 허혈

상태의 심근을 회복시키기 위해서는 신속한 재관류가 필요하지만 때로는 재관류가 백혈구 침착, 산화물 축적 등을 유발 시킴으로써 오히려 심근세포를 손상시키는 재관류 손상(Ischemia/Reperfusion injury, RI)을 유발한다.<sup>1)</sup> 따라서 완전한 심근의 회복을 위해서는 재관류 손상을 완화시키려는 허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IPC)가 필요하다. 일시적 허혈성 전처치는 다양한 조직 및 세포를 연속적이면서 심각한 허혈 상태에서부터 보호할 수 있다.<sup>2)</sup> 허혈성 전처치에 의한 세포의 허혈로부터의 보호 기전에 adenosine에 의한 K<sup>+</sup> 전도도 증가가 관여한다.<sup>3)</sup> Adenosine은 백혈구의 산화대사, 혈소판 응집 및 혈전생성 등을 억제하는 기능 이외에 adenosine A<sub>1</sub> 수용체와 연결되어 있는 G<sub>i</sub>를 통하여 ATP-dependent K<sup>+</sup> 통로(K<sub>ATP</sub>)의 활성을 유발하여 K<sup>+</sup> 전도도를 증가시키는 것

논문접수일 : 2005년 7월 6일

수정논문접수일 : 2005년 9월 20일

심사완료일 : 2005년 10월 18일

교신저자 : 한재희, 660-751 경남 진주시 칠암동 92

경상대학교 의과대학 생리학교실

전화 : (055) 751-8723 · 전송 : (055) 759-0169

E-mail : jheehan@gsnu.ac.kr

으로 알려져 있다.<sup>4)</sup>

허혈성 전처치의 중요한 기전으로서 adenosine과 K<sub>ATP</sub> 통로에 대한 활발한 보고와는 달리, 허혈성 전처치에 관여할 수 있는 muscarinic K<sup>+</sup> 통로(K<sub>ACh</sub>, GIRK)의 역할에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서 허혈성 전처치의 한 기전으로서 K<sub>ACh</sub> 통로의 역할을 기대하는 것은 허혈성 전처치 기전 중 K<sup>+</sup> 전도도의 증가가 심방에서는 K<sub>ACh</sub> 통로를 통하여 이루어 질 가능성이 높기 때문이다. 심방의 K<sup>+</sup> 전도도는 대부분 inward rectifier 포타슘 통로와 K<sub>ACh</sub> 통로를 통하여 조절되며, 특히 K<sub>ACh</sub> 통로는 심박동조절 및 심장 부정맥과 밀접한 관련이 있으며,<sup>5)</sup> 인산화 및 탈인산화에 의하여 심장의 허혈시 방어기전으로 작용한다.<sup>6,7)</sup> 허혈성 전처치 기전 중의 하나인 K<sup>+</sup> 전도도 증가와<sup>8)</sup> 심방에서  $\beta$ -adrenergic receptor를 자극할 때 ACh에 의한 K<sub>ATP</sub> 전류 활성화에 PKC가 관여하고 있다는 것이 보고되었다.<sup>9)</sup> 그리고 adenosine은 adenosine 수용체의 활성화에 의해 PKC를 활성화 시키며 K<sub>ATP</sub> 통로를 열어 활동전압기간을 감소시킴으로써 허혈성 전처치의 심근 보호작용에 중요하게 작용하고 있다.<sup>10)</sup> 특히 Wang과 Lipsius의 연구<sup>9)</sup>에서 PKC는 ACh에 의해 활성화되는 K<sup>+</sup> 전류의 전도도를 상승시켰다. 이러한 현상은 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가와 관련이 깊은 것으로 보고되었다. 이는 허혈 등에 의하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>이 증가할 때 K<sub>ATP</sub>와 더불어 K<sub>ACh</sub> 전류의 증가도 반영되는 것으로 보여 흥미롭다. 현재까지 PKC가 직접 또는 간접적으로 심방의 K<sub>ACh</sub> 통로의 활성화에 기여하는 지 밝혀져 있지 않지만 병리적 상태에서 PKC는 의미있는 K<sub>ACh</sub> 조절인자로 작용할 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐 심방세포의 초기 허혈시 K<sub>ACh</sub> 통로의 활성화여부와 만약 허혈상태에서 K<sub>ACh</sub> 통로가 활성화된다면 그 조절인자로서 PKC의 가능성을 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 단일 심방 세포의 분리

실험에 사용한 심방세포는 암수 구분 없이 8주령 이상의 쥐(Sprague Dawley)에서 적절한 심장에서 분리하였다. 150 gm 내외의 성숙한 흰쥐를 xylazine 5 mg과 ketamine 5 mg 혼합액을 복강 속에 주사하여 마취시킨 다음, 흉곽을 열고 심장을 적출하여 Lagendorff column으로 옮겨 peristaltic pump(SMP 23, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 4 mL/min의 관류속도로 normal Tyrode 용액(CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM)을 약 50 mL 정도 관류시켰다. 그 다음 칼슘을 제거한 Tyrode 용액(Ca<sup>2+</sup>-free 용액)을 5분 정도 관류시켜 심장을 정지시킨 후 0.5 mg/mL collagenase(Type II, Worthington)가 첨가된 Ca<sup>2+</sup>-free 용액을 이용하여 20~25 분간 소화시켰다. 육안으로 심장의 소화를 확인한 후, 다시 Ca<sup>2+</sup>-free 용액으로 collagenase를 씻어 내고 심방만을 분리하였다. 분리한 심방을 K<sup>+</sup>-rich 용액에 넣고 잘 흔들어 단일 심방 세포로 분리시킨 다음 12 mm

의 원형 cover glass를 35 mm Petri dish 안에 놓고 그 위에 단일 심방 세포 부유액을 2 mL 가량 분주하여 냉장 보관하면서 세포를 cover glass위에 가라앉도록 하였다. 실험에 이용한 심방세포는 분리 후 8시간 이내의 단일 세포 중 현미경으로 관찰하여 횡문(striation)이 뚜렷하고, 막대 모양을 유지한 세포만을 골랐다.

### 실험 용액

심방세포를 분리하기 위해서 정장용액(K-H 용액)과 Ca<sup>2+</sup>-free 용액을 사용하였다. K-H 용액은 NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, HEPES 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, pyruvate 10 mM, glucose 10 mM로 조성하였으며, Ca<sup>2+</sup>-free 용액은 K-H 용액에서 CaCl<sub>2</sub>를 빼고 조성하였다. 또한 단일 세포로 분리한 심방세포는 KOH 70 mM, L-glutamate 50 mM, KCl 40 mM, taurine 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, glucose 10 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0.5 mM로 조성된 용액에 보관한 후 실험에 이용하였다.

단일 통로의 기록에 사용되는 용액은 KCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM, EGTA 5.0 mM, HEPES 10.0 mM로 조성된 K-5 용액을 사용하였고, 필요에 따라 10  $\mu$ M ACh이나 100  $\mu$ M adenosine, 100  $\mu$ M KCN 등을 첨가하여 사용하였다. DMSO를 용매로 사용한 물질을 관류시킬 때는 DMSO의 농도를 1,000배 이상 희석하여 사용하였다. 실험 용액의 pH는 7.4로 맞추었다. 용액의 관류는 내경 0.5 mm의 관류관을 세포에 최대한 가까이 접근시켜 실험용액이 빠르게 교환되도록 하였으며, 용액의 관류속도는 약 2 mL/min로 하였고, 실험은 실온(22~24°C)에서 진행하였다.

### 실험적 허혈처리

본 실험에서 허혈은 두 가지 방법으로 유발하였다. 첫째 방법은 심장 조직이 필요로 하는 산소의 공급을 차단하는 방법으로써, 관상동맥을 통한 관류액 및 산소의 공급을 중단하는 방법과 산소 대신 100% 질소로 포화된 관류액을 관류시키는 방법을 이용하였다. 둘째 방법은 화학적 허혈 조건을 만드는 것이다. 화학적 허혈은 미토콘드리아 수준에서 ATP의 생산을 방해하는 cyanide<sup>11)</sup>를 관류시켜 화학적 허혈을 유발시키거나, 허혈 조건에서 많이 증가하는 adenosine을 관류시켜 허혈조건으로 만들었다.

정상 세포에서 adenosine의 농도는 대사활동에 따라 그 양이 쉽게 변하기 때문에<sup>12)</sup> 정확한 농도를 측정하기 어려우나 세포 안에 약 6 $\pm$ 1 nM 정도 존재하며, 허혈이 발생한 후 20분 후에는 133 nM, 90분 후에는 354 nM까지 증가하는 것으로 알려져 있다. 그리고 허혈시 세포 밖의 adenosine의 농도는 정상 상태의 농도(<0.5  $\mu$ M) 보다 훨씬 더 증가하는 데, Schulz 등<sup>13)</sup>은 10  $\mu$ M 이상 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 세포밖에 100  $\mu$ M adenosine을 사용하여

허혈을 모방한 후 이 조건에서  $K_{ACh}$  통로의 변화를 관찰하였다.

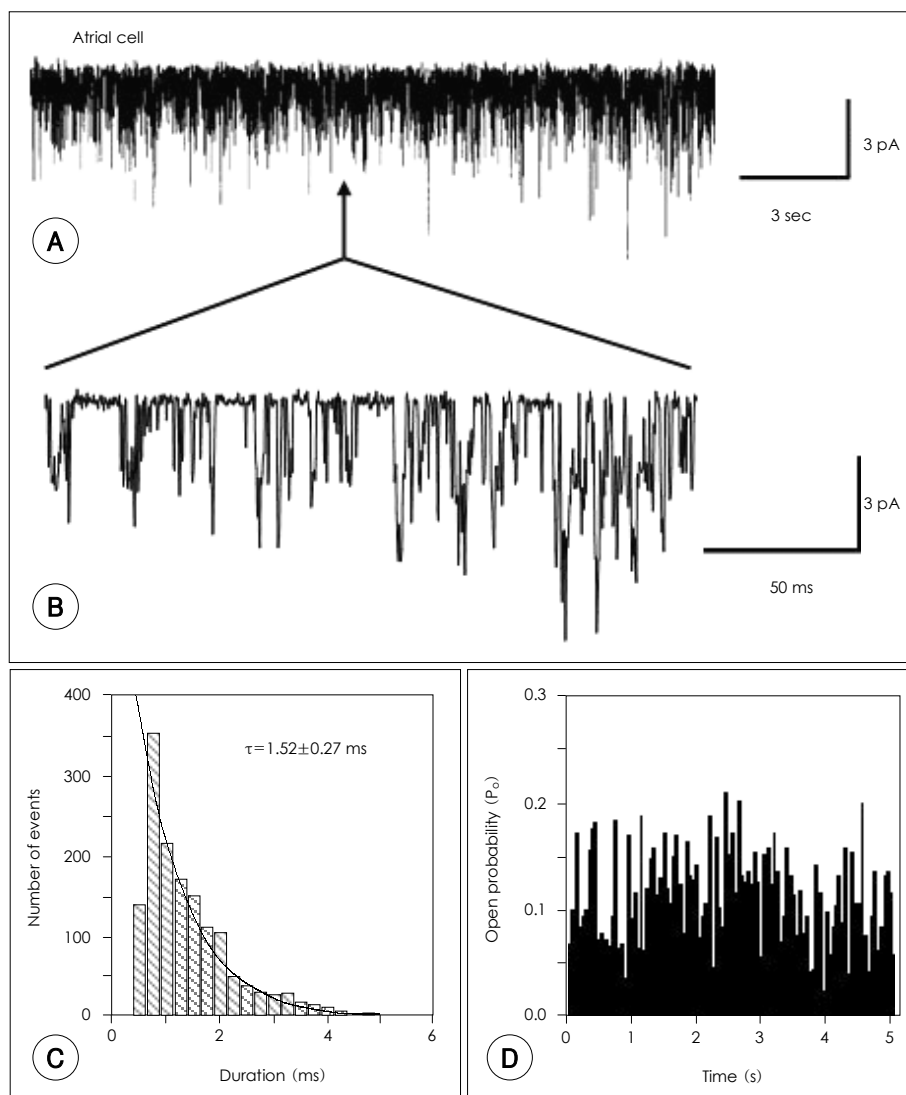
### Muscarinic $K^+$ 통로( $K_{ACh}$ )의 기록

본 실험에서는 세포질의 성분을 유지한 상태로 막전압을 임의로 변화시키면서 단일 통로를 기록하기 위하여 patch clamp 기법 중 cell-attached patch mode를 이용하였다. 도립 현미경(Axiovert 135, Zeiss, Germany) 위에 설치된 0.5 mL 크기의 실험용기에 K-5 용액을 먼저 채운 후, 심방 세포가 가라앉아 있는 원형 cover glass를 조심스럽게 실험 용기로 옮긴 후 2~3분간 회복시켰다. 막전압을  $-60$  mV 또는  $-80$  mV로 고정하고 cell-attached mode에서 단일 통로의 활동을 1분 가량 기록하면서 안정상태에 도달하였는지 확인한 후 실험을 진행하였다. 단일 통로 전류의 기록은 patch clamp 증폭기(Axopatch 1D, Axon, Union City, USA)를 통하여 증폭된 전류를 8-pole Bessel filter(AI 2049, Axon, Union City, USA)를 이용하여

3 kHz에서 여과시켰다. 여과된 신호는 A/D convertor(TL-1 DMA interface, Axon, Union City, USA)를 통하여 컴퓨터 모니터로 관찰하면서, 동시에 신호변조기(pulse code modulator, PCM-2, Medical Systems, USA)를 거쳐 VCR tape에 저장하였다가 결과의 분석 시 재생하여 이용하였다.

### 결과 분석 및 통계 처리

VCR tape에 저장되어 있던 실험 결과를 재생시키면서 필요한 부분을 A/D converter를 통하여 컴퓨터에 파일을 만들고 이를 분석 프로그램(pClamp V6.02, Axon, Union City, USA)에서 mean open time( $\tau_o$ )과 open probability를 구하여 통로의 활동도(NP<sub>o</sub>)를 계산하였다. 한 patch 내에 많은 수의 이온 통로가 관찰되는 예가 흔하기 때문에  $\tau_o$  값은 단일 통로만을 선택하여 측정된 평균치로 정하였다. 약물에 의한 반응은 약물 투여 후 항정상태를 유지하는 1분 이후의 통로 반응으로 평가하였다. 대조군과의 비교는 Student's *t*-test



**Fig. 1.** Single-channel recording of muscarinic  $K^+$  channel in atrial cell. A: a cell-attached patch was formed with ACh in the pipette. Membrane potential was held at  $-80$  mV. B: expanded current tracing from arrow region of A is shown. C: open time duration histogram was obtained from channel opening at  $-80$  mV. D: channel open probability at  $-80$  mV was plotted. ACh: acetylcholine.

로 통계 분석하여 p 값이 0.05 이하일 때 유의하다고 판단하였다. 모든 결과는 mean $\pm$ SD와 관찰한 patch의 수(n)를 함께 표시하였다.

## 결 과

### K<sub>ACh</sub> 통로의 전기 생리학적 특성

단일 심방세포에서 10  $\mu$ M acetylcholine(ACh)이 들어있는 pipette 용액을 사용하여 cell-attached patch mode에서 기록한 단일 통로 이온 전류의 크기는 -80 mV에서 약 40 $\pm$ 4 pS이었고, mean open time은 1.5 $\pm$ 0.3 ms이었다. 그리고 통로의 열릴 확률(P<sub>o</sub>)은 0.15 $\pm$ 0.05 내외였다(Fig. 1). K<sub>ACh</sub> 통로는 inward rectifier(I<sub>K1</sub>) 및 K<sub>ATP</sub> 통로와 더불어 inward rectification을 보이는 대표적인 통로로 알려져 있다.<sup>14)</sup> 앞선 보고와 동일하게 유지전압 -80 mV에서 약 40 pS을 보이던 전류가 막전압을 +80 mV로 변화시켰을 경우 10 pS의 전도도를 보이는 전형적인 inward rectification을 보였다(data not shown). 또한 pipette 내에 ACh이 존재하지 않는 경우에는 단일 통로 전류가 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통하여 본 실험에서 기록한 단일 통로는 ACh에 의하여 활성화되는 K<sup>+</sup> 전류임을 알 수 있었다.

### 실험적으로 유발된 허혈조건에서 K<sub>ACh</sub> 통로의 변화

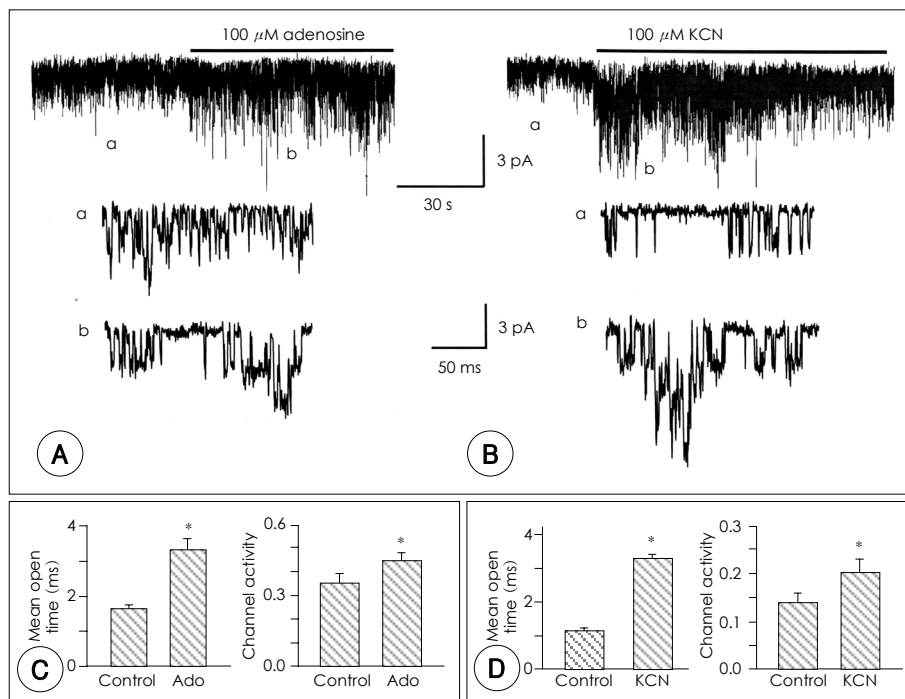
Adenosine은 ATP의 대사산물로서 허혈시 세포 밖에 많이 증가하는 물질 중의 하나이다. 세포 밖에 100  $\mu$ M adenosine

을 관류하여 허혈과 비슷한 조건으로 만든 후, 10  $\mu$ M ACh이 들어 있는 pipette 용액을 사용하여 cell-attached patch mode에서 K<sub>ACh</sub> 통로의 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 2A). Adenosine(100  $\mu$ M)은 mean open time과 통로 활동도(NP<sub>o</sub>)를 각각 97%, 26% 증가시켰다(n=9, Fig. 2C). Adenosine을 관류하여 허혈조건을 만든 경우는 주로 mean open time이 유의하게 증가하는데(p<0.05), 이러한 반응은 인산화 반응과 비슷하다. Adenosine에 의한 mean open time의 증가는 곧 K<sub>ACh</sub> 전도도의 증가에 기여하게 되고 심장의 활동을 감소시킬 것으로 생각되었다.

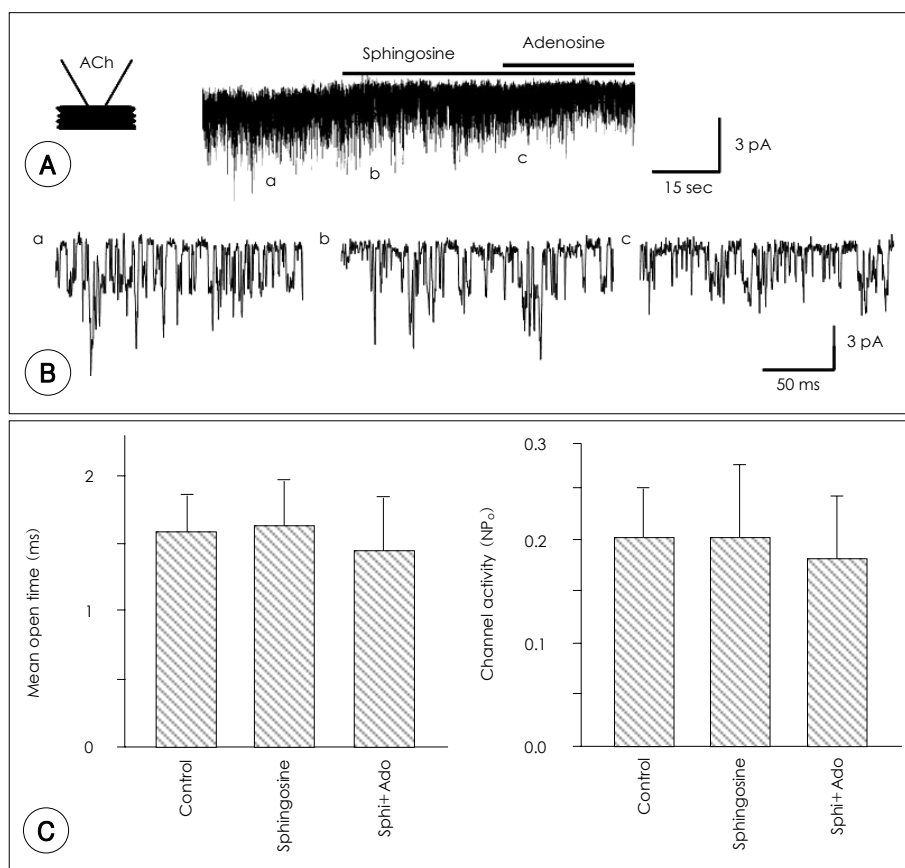
대사억제제인 potassium cyanide(KCN)를 관류시켜 화학적 허혈을 유발하였을 때 K<sub>ACh</sub> 통로의 반응을 관찰하였다(Fig. 2B). KCN(100  $\mu$ M)을 관류시켰을 때에도 adenosine의 작용과 마찬가지로 K<sub>ACh</sub>의 mean open time이 정상용액, 1.15 $\pm$ 0.07 ms에서 KCN 관류시 3.31 $\pm$ 0.10 ms로 약 3배 가량 증가하였다(n=9, p<0.05). 또한 통로 활동도는 정상용액에서 0.14 $\pm$ 0.02, KCN 관류시 0.20 $\pm$ 0.03로 유의하게 증가하였다(n=9, p<0.05; Fig. 2D). 대사억제제인 cyanide에 의하여 K<sub>ACh</sub> 통로가 조절되는 양상 역시 mean open time을 주로 증가시켰다.

### PKC 활성화에 의한 K<sub>ACh</sub> 통로 변화

K<sub>ACh</sub> 단백질은 N-terminal과 C-terminal에 인산화 될 수 있는 부위(serine, threonine residue)를 가지고 있다. 특히, PKC는 여러 연구자들 사이에 정상상태의 심장에서 K<sub>ACh</sub>



**Fig. 2.** Effect of adenosine and KCN on the activity of the muscarinic K<sup>+</sup> channel. A and B: cell-attached patches were obtained and addition of 100  $\mu$ M adenosine and KCN caused a marked increase in K<sub>ACh</sub> activity. Expanded current tracings are shown from the tracing in C and D: bar graph showing the effect of adenosine and KCN on mean open time and channel activity of K<sub>ACh</sub>. Each bar is the mean $\pm$ SD of 5 determinations. \*: significant difference from the control (p<0.05). Ado: adenosine, KCN: potassium cyanide, K<sub>ACh</sub>: muscarinic K<sup>+</sup> channel.



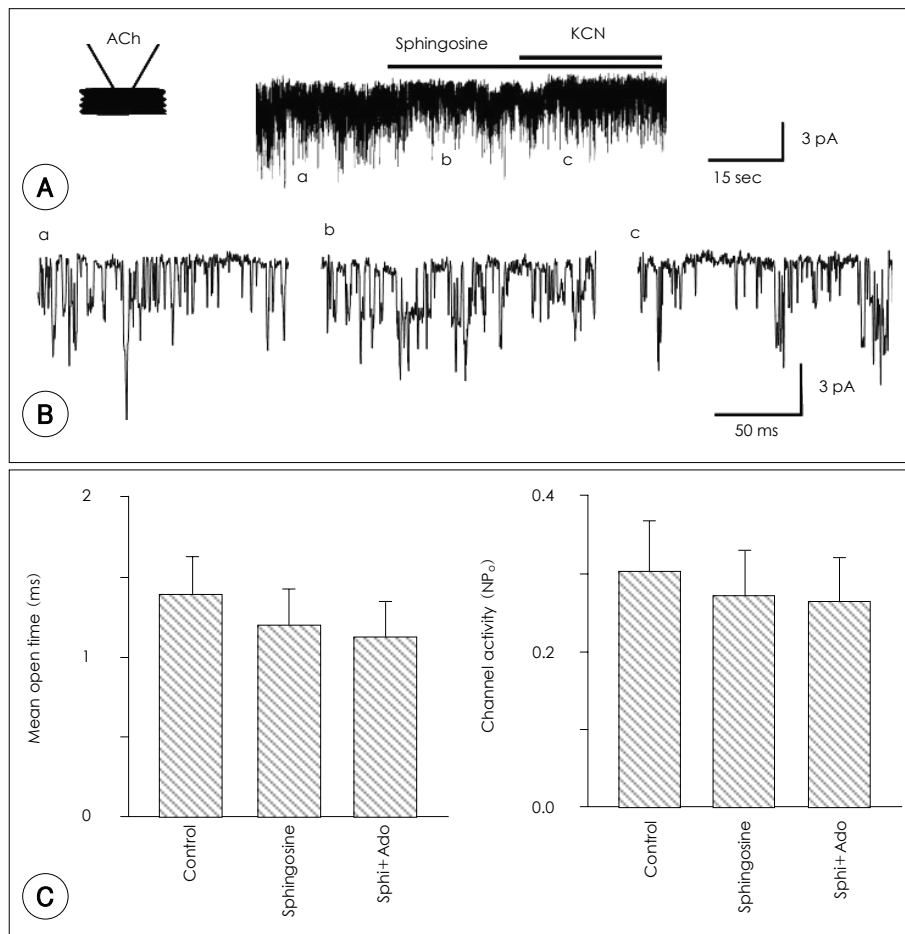
**Fig. 3.** Spingosine inhibits effect of adenosine on muscarinic K<sup>+</sup> channels. A: addition of 2  $\mu$ M sphingosine had no effect on K<sub>ACh</sub> activity, then addition of 100  $\mu$ M adenosine showed small inhibition of K<sub>ACh</sub> current. Membrane potential was held at -80 mV. B: expanded current tracings are shown from the tracing in A. C and D: bar graph showing the effect of sphingosine and adenosine on K<sub>ACh</sub> mean open time and activity. Each bar is the mean  $\pm$ SD of 5 determinations. Ado: adenosine, Sphi: sphingosine.

통로를 조절할 수 있는 하나의 인자로 설명되고 있다. 그러나 허혈상태의 심장에서의 PKC의 역할에 대해서는 연구가 미진한 상태이다. 본 실험에서는 먼저 허혈 심방세포에서 PKC의 작용을 알아보았다. Adenosine을 관류하기 전에 PKC 억제제인 sphingosine을 먼저 관류하여 PKC의 작용을 억제한 후 adenosine의 효과를 확인하였다(Fig. 3). 정상용액에서 sphingosine 2  $\mu$ M을 전처리한 후 K<sub>ACh</sub> 통로의 활동도를 관찰하였을 때 mean open time과 통로활동도는 유의한 변화가 없었다( $p>0.05$ , Fig. 3). 이러한 결과는 adenosine에 의한 mean open time의 증가 및 통로 활동도의 증가는 PKC를 경유하는 반응임을 제시한다. 다른 PKC 억제제인 Gö 6976이나 rottlerin을 전처리한 경우에도 adenosine에 의한 K<sub>ACh</sub> 통로의 mean open time 및 통로활동도 증가는 관찰되지 않았다(data not shown). Adenosine처럼 cyanide에 의해 나타나는 mean open time의 변화도 인산화와 관련이 있을 것으로 생각되어 cyanide를 관류하기 전에 PKC 억제제인 sphingosine을 전처리하였다. Sphingosine은 cyanide에 의한 K<sub>ACh</sub> 통로의 mean open time 및 통로 활동도 증가 효과를 억제하였다(Fig. 4). PKC  $\alpha$ 와  $\beta$ I의 specific inhibitor인 Gö 6976 10 nM을 전처리하고 cyanide를 투여한 경우, mean open

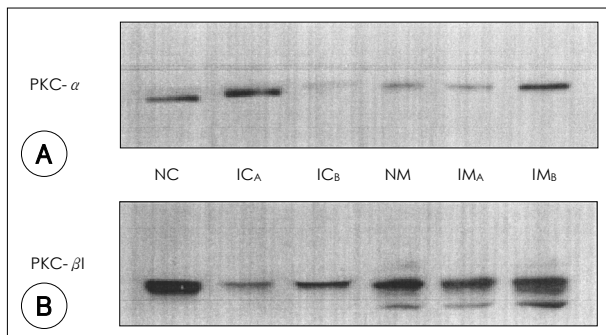
time은 정상용액에서  $1.60 \pm 0.22$  ms, Gö 6976 투여시  $1.54 \pm 0.31$  ms, Gö 6976과 cyanide를 동시에 투여한 경우  $1.60 \pm 0.20$  ms로, cyanide에 의하여 증가되던 mean open time의 증가가 Gö 6976에 의하여 차단되었다( $n=5$ ). PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\delta$ 에 specific blocker인 rottlerin 30  $\mu$ M을 전처리하였을 때, mean open time은 정상용액에서  $0.19 \pm 0.03$  ms, rottlerin 투여시  $0.19 \pm 0.03$  ms, rottlerin과 cyanide를 동시에 투여시  $0.19 \pm 0.02$  ms로 KCN에 의한 mean open time의 증가가 rottlerin에 의하여 차단되었다( $n=5$ ). Adenosine과 KCN에 의해 활성화되는 K<sub>ACh</sub> 통로활동도 역시 Gö 6976과 rottlerin에 의해 차단되었다( $n=5$ ).

#### Western blotting에 의한 protein kinase C isoform의 동정

정상 심장의 세포질(Nc)과 세포막(Nm), 2시간 동안 산소를 공급하지 않고 실온에 방치한 심장의 세포질(ICa)과 세포막(IMa) 및 2시간 동안 100% N<sub>2</sub>를 공급한 세포질(ICB)과 세포막(IMB)에서 어떤 PKC 아종이 활성화되는지 확인하기 위하여 Western blotting을 시행하였다. 10종의 PKC 아종( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ )에 대한 특이항체(specific Ab)를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 중



**Fig. 4.** KCN has no effect on muscarinic K<sup>+</sup> channel pretreated with PKC inhibitor. A: KCN (100  $\mu$ M) was applied to cell-attached patches after pretreating of sphingosine. B: expanded current tracings from A are shown as indicated by the lower case letters. There were no long-lived openings present in these experiments. C: bar graphs show the effect of sphingosine and KCN on K<sub>ACh</sub> activity and mean open time. Open lifetimes were obtained using the single-channel analysis program. Each bar is the mean  $\pm$  SD of 5 determinations. Ado: adenosine, Sphi: sphingosine, PKC: protein kinase C.



**Fig. 5.** Translocation of PKC isoforms in ischemic heart. Western blot analysis was performed using normal and ischemic heart (A and B). NC: normal cytosolic fraction, IC<sub>A</sub>: ischemic cytosolic fraction prepared without O<sub>2</sub> perfusion for 2 hrs, IC<sub>B</sub>: ischemic cytosolic fraction prepared with 100% N<sub>2</sub> perfusion for 2 hr, NM: normal membrane fraction, IM<sub>A</sub>: ischemic membrane fraction prepared without O<sub>2</sub> perfusion for 2 hrs, IM<sub>B</sub>: ischemic membrane fraction prepared with 100% N<sub>2</sub> perfusion for 2 hr, PKC: protein kinase C.

PKC  $\alpha$ 는 IC<sub>A</sub>에서 증가하고 IC<sub>B</sub>에서 감소하였으며, IM<sub>A</sub>에서는 거의 변화가 없었으나 IM<sub>B</sub>에서는 현저한 증가를 보여, 주로 100% N<sub>2</sub> gas를 관류하여 허혈을 일으킨 심장조직에서 이

동되는 것이 확인되었다(Fig. 5A). PKC  $\beta$ I은 IC<sub>A</sub> 및 IC<sub>B</sub>에서 줄어들고 IM<sub>B</sub>에서 현저히 증가하였다. 그러나 IM<sub>A</sub>의 경우는 정상 세포막과 차이를 보이지 않았다(Fig. 5B). PKC  $\alpha$ 와  $\beta$ 를 제외한 다른 아종은 세포 성분에 따른 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(data not shown). 이상의 결과로 PKC  $\alpha$  및 PKC  $\beta$ I 아종이 허혈시 세포막으로 이동되며, 실온에 방치하여 허혈을 유발한 경우보다는 2시간 동안 N<sub>2</sub> gas로 perfusion한 경우에 더욱 뚜렷한 세포막으로의 이동 양상을 보였다.

## 고 찰

### 심방 세포에서 실험적 허혈의 유발

실험 동물을 직접 사용하는 생체 실험(*in vivo* study)에서 심장에 허혈을 유발시키는 방법으로 관상동맥을 묶어 혈류를 차단하는 방법 등을 이용하면 쉽게 허혈을 유발할 수 있다. 그러나 단일 세포로 분리된 심방세포는 조직에 산소를 공급하던 혈관이 이미 제거되었기 때문에 허혈을 유발하기가 쉽지

않다. 이런 이유에서 많은 연구자들은 실험적으로 허혈(simulated ischemia)을 유발하는 방법을 사용하였다. 예를 들면, 관류액 속의 산소를 제거하거나, cyanide와 같은 oxidative phosphorylation을 방해하는 약물을 사용하거나, 허혈시 증가하는 lactate,  $H^+$ , adenosine 같은 물질을 관류액에 첨가하여 허혈을 유발시킨다.

본 실험에서는 cell-attached mode에서 관류액에 100  $\mu M$  adenosine을 첨가하거나, 100  $\mu M$  cyanide를 첨가하여 실험적 허혈을 유발하였다. Adenosine은 ATP 분해산물로, 심장 허혈(myocardial ischemia) 및 만성 심부전과 같은 상황에서 증가한다고 보고되어 있다.<sup>15)</sup> Cyanide는 cytochrome oxidase의 작용을 억제하여 mitochondria에서 ATP 생산을 방해하므로 화학적 허혈을 유발한다.

### 허혈시 $K_{ACh}$ 통로의 조절 및 역할

$K_{ACh}$  통로는 주로 생리적 조건에서 안정막 전압과 활동전압을 형성하는데 관여하는 ligand-operated 통로이다. 이 통로는 주로 동방결절, 방실결절, 심방 및 Purkinje 섬유에 분포하여 심장의 흥분성을 감소시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.  $K_{ACh}$  통로가 활성화되면 안정막전압이 과분극되고, 활동전압의 기간이 짧아져 근수축력이 감소된다.<sup>16)</sup> 만일 심장 허혈시 이 통로의 활성이 증가된다면,  $K_{ACh}$  통로는 막전압을 안정화시키므로 허혈성 부정맥의 발생을 줄이고, 근수축력을 감소시켜 근수축에 필요한 에너지를 아낄 수 있으므로 허혈로부터 심장을 보호하는데 기여할 것으로 생각된다.

최근까지 심장 허혈시 활동전압 기간의 감소에 관여하는  $K^+$  통로는 주로 ATP 감소에 반응하여 활성화되는  $K_{ATP}$  통로라고 생각하여 왔다.<sup>17)</sup> 이러한 생각은  $K_{ATP}$  통로 억제제인 glibenclamide에 의해 저산소증때 관찰되는 활동전압 기간이 짧아지지 않는다는 실험결과에 의해 뒷받침되고 있다.<sup>18)</sup> 그러나  $K_{ATP}$  통로가 열리기 위해서는 세포내 ATP 농도가  $\mu M$  수준까지 낮아져야 하지만,<sup>19)</sup> 허혈이 유발되었거나 대사억제제 투여시에도 세포내 ATP 농도가 여전히 mM 수준으로 유지된다는 보고는<sup>20)</sup>  $K_{ATP}$  통로가 허혈시 활동 전압의 기간 단축에 관여할 수 있을지에 대해 의문을 가지게 한다. 현재 이러한 의문은  $K_{ATP}$  통로가 세포내 ATP 농도 감소 뿐만 아니라, 허혈시에 증가하는  $H^+$ , ADP, GDP, adenosine 등의 다양한 물질들에 의해서도 활성이 조절된다는 것으로 설명하고 있다.<sup>21)</sup> 그러나 현재까지 다른  $K^+$  통로가 허혈시에 활성화된다는 것은 보고된 바 없다. 특히, 심장 세포에서 분비되는 adenosine은 심방근과 심실근에서 심근 수축력을 감소시키는 등 강력한 심혈관계 작용을 한다는 것이 잘 알려져 있다.<sup>22)</sup> 이러한 adenosine의 유리는 허혈시 증가하는데,<sup>23)</sup> 세포 안에서 생산되어 세포밖에 축적된 adenosine은 심근의 G-protein 경로를 통하여  $K_{ATP}$  통로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>24)</sup> 그런데 최근 흥미롭게도 adenosine과 acetylcholine이

동일한  $K^+$  통로를 활성화시킨다는 것이 알려졌다. Kurachi 등<sup>25)</sup>은 같은 종류의  $K^+$  통로에 adenosine과 muscarinic receptor가 연결되어 있으며 이들의 작용은 G-protein을 통하여 일어난다고 보고하였다. 이러한 결과는 허혈시  $K_{ACh}$  통로가 작용할 가능성이 있다는 것을 의미한다.

본 실험에서 oxidative phosphorylation이 중단되고 anaerobic glycolysis가 일어난 경우 증가하는 adenosine 또는 mitochondria에서 ATP 생산을 방해하는 cyanide가  $K_{ACh}$  통로에 미치는 효과를 관찰한 결과 mean open time과 통로활동도의 증가가 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 인산화 및 cytosol factor의 변화로 생각된다. 본 실험실의 예비실험 결과, KCN에 의한 허혈 유발시 cytosol factor 중 transferrin이 두드러지게 감소하였다. transferrin은 ATP와 상관없이  $K_{ACh}$  통로의 활성도를 감소시켰다. 따라서 mean open time의 증가는 주로 인산화에 의한 결과로 생각되며, 통로활동도는 transferrin과 같은 cytosol factor의 변화에 따른 결과로 생각된다. 또한 adenosine과 cyanide에 의한  $K_{ACh}$  통로의 조절과정에 PKC가 관여하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3, 4). 특히 PKC 아종 중 classical type에 속하는 아종은 세포막으로의 이동이 두드러지게 나타났다(Fig. 5). 따라서 허혈 조건에서  $K_{ACh}$  통로의 활성이 증가하며, 이 과정에 PKC를 통한 인산화반응이 관여한다는 것을 알 수 있다. 손 등<sup>26)</sup>의 연구결과에 의하면 PKC는 특히 성체 쥐의 심근 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 심근 보호 기능은 PKC  $\alpha$ 와 PKC  $\epsilon$ 의 세포막 분획에서의 활성화와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고하였다.<sup>27)</sup>

이상과 같은 허혈시 관찰되는 PKC 경로를 통한  $K_{ACh}$  통로의 mean open time의 증가 및 통로활동도의 증가는 심방의  $K^+$  전도도의 증가를 초래하여 심방의 흥분성을 낮추고, 활동전압의 기간을 단축시키며, 수축력을 감소시키고, 심방에서 심실로 전도되는 속도를 낮추어 심장을 보호하는 기전으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 예측은  $K^+$  통로를 여는 여러 가지 합성된 약물을 투여하면 허혈시 심근의 보호 효과가 나타난다는 사실과 일치한다.<sup>28)</sup> 그러나  $K_{ACh}$  통로가 활동전압기간을 짧게하여 심실세동의 원인이 된다는 상반된 연구 결과도 있다.<sup>29)</sup> 최근에 adenosine이 adenosine A1 receptor,  $m_2$  muscarinic receptor,  $\alpha 1$  receptor, bradykinin  $B_2$  receptor를 통하여 허혈 조건에서 심장을 보호하는 것으로 알려져 있다.<sup>30)</sup> 이러한 결과는 adenosine이  $m_2$  muscarinic receptor를 통하여  $K_{ACh}$  통로의 전도도를 증가시켜 허혈 초기에 심장 기능의 보호에 기여할 가능성이 있는 것을 보여준다. 본 실험을 진행하면서 허혈 초기에는 대개  $K_{ATP}$  통로의 활성 없이  $K_{ACh}$  통로의 활성만 관찰되는 시기를 확인하였다. 이러한 사실은 대개의 허혈 조건에서  $K_{ACh}$  통로가 비교적 생리적인 조건에서 먼저 심장의 흥분성을 줄이는데 관여하고,  $K_{ATP}$  통로는 오랫동안 허혈에 노출된 경우에 심장의 흥분성을 줄이는데 관여할 가능성이 높다는 것을 의미한다.

다. 따라서 허혈성 전치치를 일으켜 심장의 기능을 보존하고 허혈 손상을 줄이는 경우나 허혈 초기 비교적 생리적 조건에서는 K<sub>ACh</sub> 통로의 활성이 심장의 흥분성을 줄여 심근 보호효과를 나타내는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 본 실험만으로는 adenosine 또는 cyanide가 어떤 경로를 거쳐 K<sub>ACh</sub> 통로를 조절하는지, 허혈시 얼마나 심근보호효과를 나타내는지는 정확히 알 수 없다. 그러나 본 실험에 사용한 PKC 억제제 sphingosine, Gö 6976 및 rottlerin의 반응은 동일하게 KCN과 adenosine에 의한 K<sub>ACh</sub>의 mean open time 및 통로활동도 증가를 억제하였다. 이러한 결과는 KCN과 adenosine에 의한 K<sub>ACh</sub>의 통로 활성도의 변화에 있어 PKC의 관련성을 연구하게 하였으며, adenosine과 KCN에 의한 mean open time 및 통로 활동도의 증가는 다음과 같이 추정할 수 있다. adenosine은 adenosine 수용체와 연계된 G-단백질을 자극하여 phospholipase C를 활성화시키고 이차 전달체인 diacylglycerol(DAG)을 증가시켜 PKC를 활성화시켜서 최종 효과기의 인산화에 기여할 것으로 생각되며, KCN의 경우에는 인산화과정 및 허혈시 유발되는 cytosol factor의 변화에 기인 할 것으로 추정된다. 따라서 허혈시 K<sub>ACh</sub> 통로의 조절 경로에 대한 연구와 허혈 시간대 별 K<sub>ACh</sub> 통로의 조절 양상에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

최근 연구는 다양한 포타슘 통로가 허혈 심장에서 발현되는 것을 보고하였다. 정상 심방세포에 분포하고 있는 포타슘 통로는 인산화에 의하여 조절된다. 그러나 허혈시 K<sub>ACh</sub> 통로의 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 초기 허혈시 K<sub>ACh</sub> 통로가 PKC에 의해 조절되는지를 확인하고자 한다.

### 방 법 :

흰쥐 심방 세포는 collagenase를 이용하여 단일세포로 분리하였다. Patch clamp 기법 중 cell-attached mode를 사용하여 K<sub>ACh</sub> 단일 이온 통로 변화를 기록하였다. Adenosine과 KCN으로 화학적 허혈을 유발하였으며, PKC isoforms을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다.

### 결 과 :

허혈 심방세포에서 adenosine과 KCN은 K<sub>ACh</sub> 통로의 활동도를 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 이러한 통로활동도의 증가는 주로 mean open time의 증가에 의해 나타났다. Adenosine과 KCN으로 유발한 허혈 상태에서 증가하는 mean open time 및 통로 활동도 증가는 PKC 억제제인 sphingosine에 의하여 억제되었다. 선택적 PKC 억제제, Gö 6976( $\alpha$  및  $\beta$ )과 rottlerin( $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\delta$ ) 역시 K<sub>ACh</sub> 통로의 mean open time 및 통로활동도의 증가를 억제하였다. 허혈시 K<sub>ACh</sub> 통로의 활동도에 관여하는 PKC 아종을 확인하기 위하여 Western

blotting을 시행한 결과 PKC  $\alpha$  및 PKC  $\beta^1$ 이 세포막으로 이동하는 것을 확인하였다.

### 결 론 :

이상의 결과를 통하여 허혈 심방세포에서 PKC의 활성에 의해 K<sub>ACh</sub> 통로 활동이 증가되는 것을 확인하였다. 인산화 과정에 관여할 것이라 예상되는 PKC 아종은 PKC  $\alpha$  및  $\beta^1$ 이며, 이러한 통로의 조절과정은 허혈시 심방기능을 보호하는데 기여할 것으로 생각된다.

**중심 단어 :** 허혈 ; Adenosine ; KCN ; 무스카린성 포타슘 통로 ; Protein kinase C.

이 연구는 2003년도 Brain Korea 21 연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

## REFERENCES

- Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994;28:1301-11.
- Reimer KA, Murry CE, Yamagawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251:H1306-15.
- Granger DN, Korthius RJ. Physiologic mechanism of postischemic injury. *Annu Rev Physiol* 1995;57:311-32.
- Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A1 receptors, K<sub>ATP</sub> channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1993;264:H1327-36.
- Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;20:103-14.
- Kim D. Modulation of acetylcholine-activated K<sup>+</sup> channel function in rat atrial cells by phosphorylation. *J Physiol* 1991;437:133-55.
- Hong SG, Pleumsamran A, Kim D. Regulation of atrial muscarinic K<sup>+</sup> channel activity by a cytosolic protein via G protein-independent pathway. *Am J Physiol* 1996;270:H526-37.
- Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997;99:55-61.
- Wang YG, Lipsius SL.  $\beta$ -adrenergic stimulation induced acetylcholine to activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in cat atrial myocytes. *Circ Res* 1995;77:565-74.
- Park JS, Seok JH, Shin DG, Kim YJ, Shim BS, Kim YH. The myocardial protective effect and change of the monophasic action potential duration by adenosine receptor, protein kinase C and K<sub>ATP</sub> channel in ischemic preconditioning in cats. *Korean Circ J* 1999;29:392-402.
- Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte: involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res* 1999;84:1388-95.
- Delaney SM, Geiger JD. Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation. *J Neurosci Methods* 1996;64:151-6.
- Schulz R, Rose J, Post H, Heusch G. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflügers Arch* 1995;430:273-82.
- Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sinauer; 1992. p.180-6.
- Kitakaze M, Hori M. It is time to ask what adenosine can do for cardioprotection. *Heart Vessels* 1998;13:211-28.
- Ten Erick R, Nawrath H, McDonald TF, Trautwein W. On the



- mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. Pflügers Arch* 1976;361:207-13.
- 17) Nakaya H, Takeda Y, Toshe N, Kanno M. *Effects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blockers on the action potential shortening in hypoxic and ischaemic myocardium. Br J Pharmacol* 1991;103:1019-26.
- 18) Cole WC, Mcpherson CD, Sontag D. *ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischaemia/reperfusion damage. Circ Res* 1991;69:571-81.
- 19) Lederer WJ, Nicols CG. *Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in isolated membrane patched. J Physiol* 1989;419:193-211.
- 20) Elliott AC, Smith GL, Allen DG. *Simultaneous measurements of action potential duration and intracellular ATP in isolated ferret hearts exposed to cyanide. Circ Res* 1989;64:583-91.
- 21) Tung RT, Kurachi Y. *On the mechanism of nucleotide diphosphate activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in ventricular cell of guinea-pig. J Physiol* 1991;437:239-56.
- 22) Belardinelli L, Linden J, Berne RM. *The cardiac effects of adenosine. Prog Cardiovasc Dis* 1989;32:73-97.
- 23) Berne RM, Rubio R. *Adenine nucleotide metabolism in the heart. Circ Res* 1974;35:109-20.
- 24) Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. *Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A1 receptors by G protein in rat ventricular myocytes. Am J Physiol* 1990;259:H820-6.
- 25) Kurachi Y, Nakazima T, Sugimoto T. *On the mechanism of activation of muscarinic K<sup>+</sup> channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. Pflügers Arch* 1986;407:264-74.
- 26) Son JW, Kim YD. *PKC activation protects the cardiomyocyte from ischemic insult in adult, but not in neonatal rat heart. Korean Circ J* 2002;32:689-96.
- 27) Kim HC, Kim H, Chung ST, et al. *Cardioprotective effect of the ischemic preconditioning: its relation to activation of protein kinase C. Korean Circ J* 1999;29:602-12.
- 28) Escande D, Caverio I. *K<sup>+</sup> channel openers and "natural" cardioprotection. Trends Pharmacol Sci* 1992;13:269-72.
- 29) Kover P, Wickman K, Maguire CT, et al. *Evaluation of the role of IKACH in atrial fibrillation using a mouse knockout model. J Am Coll Cardiol* 2001;37:2136-43.
- 30) Strasser R, Vogt A, Schaper W. *Myocardial protection by preconditioning: experimental and clinical significance. Z Kardiol* 1996;85:79-89.