Original Articles Korean Circulation J 2001;31(1):5-15

허혈성 전처치의 심근 보호효과 : 심근세포내 당원량과 Protein Kinase C 사이의 관계

성균관대학교 의과대학 해부학교실,[1] 중앙대학교 의과대학 조직학교실[2]
강원대학교 의과대학 해부학교실[3]
김호덕[1] · 김 현[1] · 라봉진[2] · 김명호[2] · 김철우[2] · 김혜원[2] · 김대중[3] · 김영배[2]

Cardioprotective Effect of Ischemic Preconditioning : Relationship between Intracellular Glycogen and Protein Kinase C

Ho-Dirk Kim, MD[1], Hyun Kim, PhD[1], Bong-Jin Rah, MD[2], Myeong Ho Kim, MD[2], Chul Woo Kim, MD[2], Hye-Won Kim, MD[2], Dae-Joong Kim, MD[3] and Young-Bae Kim, MD[2]

[1]Department of Anatomy, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon,
[2]Department of Histology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul,
[3]Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

ABSTRACT

Background : Recent studies suggest that the cardioprotective effect of ischemic preconditioning (IPC) is related to intracellular glycogen content in rat hearts, however, controversies still remain. **Methods** : To test this hypothesis, isolated Langendorff-perfused rabbit hearts were subjected to 45 min global ischemia followed by 120 min reperfusion with IPC (n=10) or without IPC (ischemic control, n=8). IPC was induced by one cycle of 5 min global ischemia and 10 min reperfusion. In the glucose (G)-free preconditioned group (n=10), G depletion-repletion was induced by perfusion with G-free Tyrode solution for 5 min and then G-containing Tyrode solution for 10 min followed by 45 min ischemia and 120 min reperfusion. For glycogen depletion or loading, hearts were treated with sodium acetate (NA, 5 mM, n=8) or insulin (Ins, 1 unit/L, n=8) for 15 min before 45 min ischemia. Left ventricular function and coronary flow (CF) were continuously recorded during experiments. Myocardial cytosolic and membrane protein kinase C (PKC) activities were measured by 32P-γ-ATP incorporation into PKC-specific pepetide ; glycogen content in the cardiac myocytes was determined by spectrophotometry with amyloglucosidase ; expression of PKC isozymes was determined by Western blot with monoclonal antibodies. Infarct size was determined by staining with tetrazolium salt and planimetry. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post-hoc test. **Results** : IPC or G-free preconditioning enhanced LV functional recovery ; NA did not influence on functional recovery but Ins depressed it. Infarct size was significantly reduced by IPC, G-free preconditioning, and NA treatment (35.3±2.1% in the ischemic control, 18.7±1.2% in the IPC, 22.1±1.2% in the G-free preconditioned, 16.3±1.2% in the NA-treated group, and 32.8±1.6% in the Ins-treated group, $p<0.05$). Membrane PKC activities significantly increased by IPC, IPC and 45 min ischemia, G-free preconditioning, and G-free preconditioning and 45 min ischemia ; especially, expression of membrane PKC-ε increased by IPC and G-free preconditioning. Glycogen content decreased

논문접수일 : 2000년 10월 16일
심사완료일 : 2001년 1월 31일
교신저자 : 김호덕, 440 - 746 경기도 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교 의과대학 해부학교실
전화 : (031) 299 - 6071 · 전송 : (031) 299 - 6089
E - mail : hdkim@med.skku.ac.kr

by 45 min ischemia, IPC, G-free preconditioning, and by NA treatment, but increased by Ins treatment. **Conclusion**: These results suggest that in rabbit heart, intracellular glycogen may not significantly be related with the cardioprotective effect of IPC; G-free preconditioning could not improve post-ischemic contractile dysfunction but it has an infarct size-limiting effect; this cardioprotective effect may be related in part to activation of PKC, especially ε isozyme. **(Korean Circulation J 2001;31(1):5-15)**

KEY WORDS: Intracellular glycogen · Ischemic preconditioning · Myocardial protection · PKC · Rabbit heart.

서 론

동맥경화나 연축 등으로 관동맥의 내강이 좁아지거나 막혀 허혈이 일어나면 심장은 펌프로서의 기능을 할 수 없다. 1980년 초반까지만 하더라도 많은 연구자들은 허혈 손상을 입은 심근은 허혈이 재발될 경우 이전보다 빨리 손상되어 경색으로 발전하는 것으로 생각하였다.[1] 그러나 Murry 등[2]은 짧은 기간 허혈과 재관류를 반복하면 심근은 후속되는 보다 긴 기간의 허혈에 대하여 경색 크기가 감소함을 관찰하고 이와 같은 현상을 허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IPC)라 하였다. IPC에 따르는 심근경색 크기 감소, 심근기능 회복 증가, 재관류 유발성 부정맥 발생빈도 감소 등의 보호효과는 지금까지 많은 동물실험을 통해 증명되고 있다.[3-9] IPC의 의의를 한마디로 말하기는 어려우나 심근세포내에 존재하는 자기보호 기전으로부터 허혈에 대항한다는 점에 있으므로 이에 관한 실험 결과들은 허혈성 심장병 치료약물의 개발이나 예방 방법 모색에 이용할 수 있기 때문에 심장연구자들의 관심의 대상이 되고 있다. 최근까지 알려진 IPC의 발생기전으로는 아데노신 수용기 자극,[10] K_{ATP} 이온통로 활성화,[11] protein kinase C(PKC) 전이,[12)13)] 당원(glycogen)고갈[14)15)] 등이 제시되고 있으나 논란이 많다.

IPC를 실시하면 심근세포내로 유입되는 당원량의 저하로 당원고갈이 일어나 당대사가 떨어지면 결과적으로 산증(acidosis)이 저하되므로 재관류시 심근기능의 회복이 증가되며 경색범위도 감소하는 것으로 추측되고 있다. 당원은 여러 개의 glucose 분자들이 모여 이루어진 다당질로 심근세포 세포질에서 흔히 관찰되는 포함물이다. 심장에서는 외부로부터 glucose 공급이 중단되면 세포질내에 축적되어 있던 당원이 인산화된 형태로 분해되면서 심근수축에 필요한 에너지(ATP)를 생산한다. Henning 등[16]의 연구결과에 따르면 외인성 glucose중 20%만이 당분해 과정에서 산화되는 반면 심근세포내에 저장되어 있던 당원으로부터 나온 glucose는 50% 이상이 당분해 과정에서 산화되며 적출 심장을 이용한 실험에서는 적어도 총 ATP 생산량의 40% 이상이 심근세포질내에 저장되었던 당원으로부터 생산된다고 한다. 또한 허혈시에는 혐기성 당분해의 증가로 심근세포내 당원 pool의 고갈과 함께 당분해의 최종 산물인 유산의 심근세포내 축적으로 세포기능 저하와 형태학적인 변화가 일어나는 것으로 알려지고 있다.

Protein kinase C(PKC)는 세포막과 세포질 사이에 있으며 세포외부의 신호를 감지하여 세포내로 전달하는 제2매개체로 자극수용체와 최종 작용체(end effector) 사이를 연결하는 편재효소(ubiquitous enzyme)로서 세포내 단백질중 serine/threonine기를 인산화하여 심근에서는 칼슘 등 이온 농도, 심박, 근수축력 등을 조절하며 유전자 발현, cardiac factor 생산, 심근비대 등 다양한 생물학적 반응들을 조절하는 것으로 알려져 있으며, IPC 효과 발생에 중요한 역할을 할 것이라는 실험결과들이 많다.[7)8)12)13)]

이상으로 연구자들은 본 실험을 통하여 심근세포내 당원량 변화가 IPC에 의한 심근보호 효과에 미치는 영향을 관찰하고 PKC와의 관계를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

미국생리학회의 실험동물 사용지침에 따라 체중 1.7 kg 내외의 흰토끼(New Zealand White rabbit)를 실험동물로 사용하였다. Heparin(300 IU/kg)을 복강내 투여하고 30분 후 후두부를 순간적으로 강타하여 실신시키고 즉시 흉부를 절개하여 심장을 적출하였다. 심장을 미리 냉각시켜둔 생리식염수에 담구어 대동맥에 카

늘라를 삽관하고 견봉합사로 묶은 후 Langendorff 관류장치(Size 5, Hugo Sachs Electronik, March - Hugstetten, Germany)에 고정하여 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, 37℃, perfusion pressure 60 mmHg, perfusion volume 30 ml/min)으로 관류하였다. 전극을 우심방 외벽에 2 3 mm 간격으로 부착하고 전기자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)로 1분당 심박동수를 150회 유지되도록 조정하였다(4.0 V, 0.5 msec interval). Tyrode 용액으로 30 50분 관류하여 심장기능이 일정하게 유지되면 이 때를 모든 실험의 기준점으로 하였다.

50분 정도의 관류에도 불구하고 기준선 혈역학 값이 일정하게 유지되지 않거나 재관류시 부정맥 발생빈도 등이 현저히 증가한 경우에는 모두 관찰대상에서 제외하였다.

실험 원안

실험 원안은 Fig. 1과 같다. 허혈 대조군(n=8)에서는 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 허혈성 전처치군(IPC군, n=10)에서는 5분 허혈, 10분 재관류를 한번 실시하여 허혈성 전처치를 유도하고 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 심근세포의 당원량을 낮추기 위한 실험으로는 2가지를 상정하였다. 첫째, glucose 결핍 전처치군(n=10)에서는 glucose 불포함 관류액으로 5분 관류하고 glucose 포함 관류액으로 10분 관류한 후 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 둘째, 심근세포의 glucose 섭취(uptake)를 차단하는 약물인 sodium acetate 투여군(n=8)에서는 glucose를 포함하지 않은, 5 mM의 sodium acetate를 포함한 관류액으로 15분 관류한 후 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 심근세포의 당원량을 높이기 위한 인슐린 투여군(n=8)에서는 인슐린(1 unit/l) 포함 관류액으로 15분 관류하고 45분 허혈후 120분 재관류하였다.

심근세포내 당원량과 PKC활성도의 변화를 보기 위하여 허혈이나 IPC 등의 처치를 하지 않은 실험군(baseline, n=5), 45분 허혈만 실시한 실험군(Isc, n=5), 허혈성 전처치만 실시한 실험군(IPC, n=5), IPC후 45분 허혈실시 실험군(IPC+Isc, n=5), glucose 결핍용액 투여 전처치만 실시한 실험군(G(-), n=5), glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 허혈실시 실험군(G(-)+Isc, n=5), sodium acetate만 투여한 실험군(NA, n=5), sodium acetate를 투여하고 45분 허혈실시 실험군(NA+Isc, n=5), 인슐린만 투여한 실험군(Ins, n=5), 인슐린을 투여하고 45분 허혈실시 실험군(Ins+Isc, n=5) 등을 추가하였다.

좌심실 기능 및 관혈류 측정

각 실험에서 Tyrode 용액으로 관류하여 일정한 상태가 유지되면 폐정맥을 통하여 좌심실에 라텍스 고무풍선을 넣고 압력전달 장치(Harvard 50 - 8952, Ma., U.S.A)에 연결하였다. 미세조정 주사기를 이용하여 라텍스 고무풍선에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end - diastolic pressure, LVEDP)이 8 10 mmHg가 되도록 조정한 후 좌심실압(left ventricular developed pressure, LVDP), 심근수축력(+dP/dt), 심박동수 등을 기록하였다. 관류를 시작하

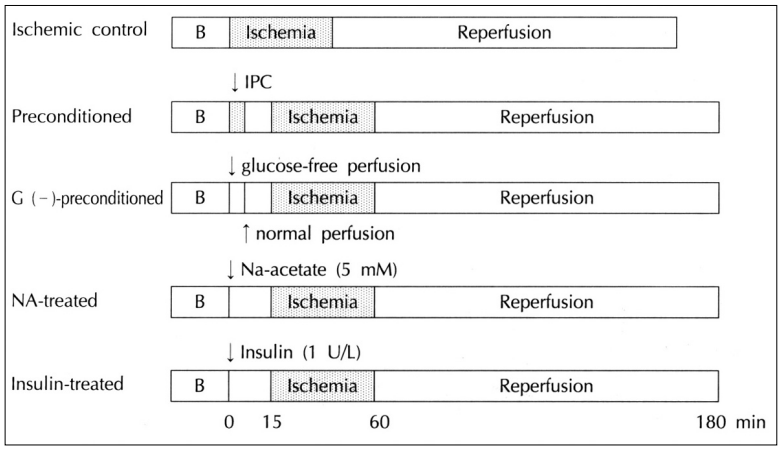

Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. In the glucose-free [G(-)] preconditioned group, hearts were subjected to perfusion with glucose-free Tyrode solution for 5 minutes and then with normal perfusate for 10 minutes before subsequent sustained ischemia. Abbreviations : B, baseline ; IPC, ischemic preconditioning ; NA, sodium acetate.

여 심장기능이 일정하게 유지되면 관류액의 누출을 방지하기 위하여 폐정맥과 대정맥을 견봉합사로 묶은 후 폐동맥을 통하여 우심실 안으로 카뉼라를 넣고 관류액이 잘 흐르도록 고정하여 단위시간당(1분) 관혈류를 측정하였다.

좌심실 경색크기 측정

경색크기는 Kim 등[9]의 방법으로 측정하였다. 각 실험이 끝나면 심장을 관류장치로부터 분리하여 실온에서 1% triphenyltetrazolium chloride(TTC, in phosphate buffer, pH 7.4)로 20분 관류한 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정후 심장을 심저부와 평행하게 2 mm 간격으로 가로 방향으로 자른 후 심저부를 향하는 단면을 촬영하여 경색크기를 측정하였다.

Protein kinase C활성도 측정

PKC활성도는 Takai 등[17]의 방법으로 측정하였다. 각 실험이 끝나면 좌심실(심실중격 포함)을 분리하여 20 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1.0 mM iodoacetic acid, 1.0 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1.0 mM EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid), 1.0 mM EGTA(ethyleneglycolbis(β-aminoethylether)N,N,N′, N′-tetraacetic acid), 10 mM β-mercaptoethanol(pH 7.4, 4℃)을 함유한 용액을 첨가하여 균질화한 후 4℃에서 100,000 *g*로 1시간 원심분리하여 상청액을 세포질분획(cytosol fraction)으로 사용하였다. 침전물을 다시 위의 용액에 Triton X-100(0.3 vol%)을 첨가한 용액으로 녹여 4℃에서 1시간 교반하고 원심분리하여 상청액을 세포막분획(membrane fraction)으로 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 반응시킨 후 방사능(radioactivity)을 측정하여 PKC활성도를 측정하였다. 이상을 각 시료마다 3회 실시하여 평균을 취하였으며, 기준선의 PKC활성도는 허혈이나 IPC없이 관류시작후 50분간 기준선의 혈역학 값이 일정하게 유지되게 하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 각 분획의 PKC활성도는 전체활성도를 100으로 하였을 때 세포질 및 세포막분획이 차지하는 백분율로 표기하였다.

당원 정량

당원량은 심근세포내의 당원을 aminoglucosidase를 첨가하여 glucose로 전환시켜 그 농도를 측정하여 결정하였다.[18] 각 실험이 끝나면 좌심실 조직을 취하여 5배의 0.6N perchloric acid를 첨가하고 균질화한 후 0.2 ml를 취하여 1M potassium carbonate 0.1 ml와 amyloglucosidase 2.0 ml를 첨가한 후 40℃에서 2시간 반응하였다. 다시 0.6N perchloric acid 1.0 ml을 가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리하고 상청액을 취하여 분광광도계(Pharmacia-LKB, UK)로 측정하였다.

Protein kinase C 동종효소의 immunoblotting

각 실험군별로 좌심실 500 mg을 취하여 SDS-sample buffer를 첨가하여 균질화하고 1시간 원심하여(20,000 *g*, 4℃) 상청액을 전기영동 시료로 사용하였다. 각 군별로 추출된 단백질(50 100 μg)을 Laemmli[19] 방법으로 25 mA에서 5시간 전기영동하였다. 전기영동으로 분리된 단백질들을 PVDF막(polyvinylidene difluoride membrane)에 이적시켜 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위하여 5% skim milk를 함유하는 TBS-T(Tris-buffered saline/Tween 20 : 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 실온에서 1시간 처리한 후 각각의 일차항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 씻어준 후 2차항체로 실온에서 1시간 반응시키고 다시 씻어준 후 enhanced chemiluminiscence(ECL kit, Amersham)로 각각의 단백질 띠를 확인하였다.

통계처리

모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였다. 전 실험군 사이의 통계학적 유의성은 분산분석으로 처리하여 유의성이 있다고 판정되면 Tukey′s post-hoc test를 이용하여 검정하였으며 상대적인 두 실험군 사이의 유의성은 t-test로 검정하였다. *p*값이 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

좌심실 기능 및 관혈류의 변화

기준선의 LVDP, +dP/dt, LVEDP 및 관혈류량은 허

혈 대조군에서 각각 80±2.7 mmHg, 1341±90 mmHg /sec, 9±0.7 mmHg, 29.0±0.15 ml/min, IPC군에서 각각 81±1.9 mmHg, 1420±65 mmHg/sec, 9±0.3 mmHg, 29.0±0.14 ml/min, glucose 결핍 전처치군에서 각각 79±2.7 mm Hg, 1345±100 mm Hg/sec, 9 ±0.4 mmHg, 29.0±0.0 ml/min, sodium acetate 투여군에서 각각 79±2.5 mmHg, 1441±59 mmHg/sec, 10±0.3 mmHg, 29.0±0.0 ml/min, 인슐린 투여군에서 각각 76±2.4 mmHg, 1321±54 mmHg/sec, 10 ±0.3 mmHg, 29.0±0.0 ml/min으로 실험군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다.

LVDP와 dP/dt의 최대값은 모든 실험군에서 재관류 이후 증가하기 시작하여 45분 이후부터 일정한 값을 유지하였으며, 허혈 대조군에 비하여 IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군에서 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 glucose 결핍 전처치군과 IPC군에서는 허혈 대조군에 비하여 LVDP가 증가한 반면 인슐린 투여군에서는 감소하였다(Figs. 2 and 3). LV - EDP는 재관류 초기에 상승하였다가 점차 감소하는 경향을 나타내었다. LVEDP의 상승폭은 재관류 초기에 허혈 대조군에 비하여 IPC군과 glucose 결핍 전처치군에서는 낮았으나 인슐린 투여군이나 sodium acetate 투여군에서는 높았다. 그러나 재관류 시간이 경과할수록 상승폭의 차이는 현저하지 않았다(Fig. 4). 관혈류는 재관류 시작후 급격히 증가하여 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 허혈 대조군에 비하여 IPC군과 glucose 결핍 전처치군에서는 증가하였으며 인슐린 투여군에서는 감소하였으나 sodium acetate 투여군에서는 큰 변화를 나타내지 않았다(Fig. 5).

심근경색 크기

심근경색 크기는 허혈 대조군, IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군, 인슐린 투여군에서 각각 35.3±2.1, 18.7±1.2, 22.1±1.2, 16.3±1.2, 32.8±1.6%로 허혈 대조군에 비하여 IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군에서 감소하였으나 인슐린 투여군에서는 유의한 변화를 볼 수 없었다 (Fig. 6).

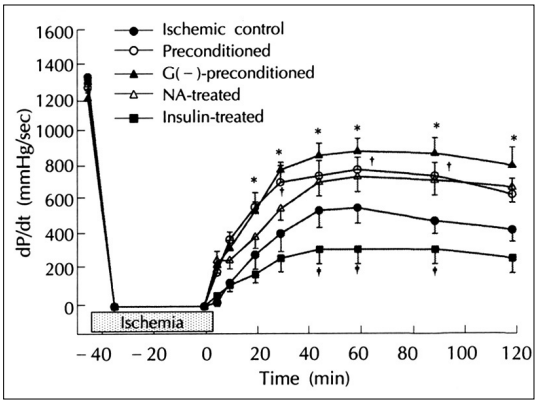

Fig. 3. Changes of the dP/dt (contractility) during ischemia and reperfusion. * : p<0.05, ischemic control vs glucose-free [G(-)]-preconditioned ; † : p<0.05, ischemic control vs preconditioned ; ‡ : p<0.05, ischemic control vs insulin-treated, analyzed by unpaired t-test.

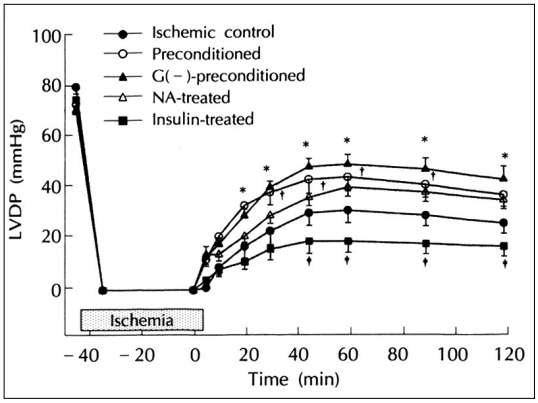

Fig. 2. Changes of the left ventricular developed pressure (LVDP) during ischemia and reperfusion. * : p<0.05. ischemic control vs glucose-free [G(-)]-preconditioned ; † : p<0.05, ischemic control vs preconditioned ; ‡ : p<0.05, ischemic control vs insulintreated, analyzed by unpaired t-test.

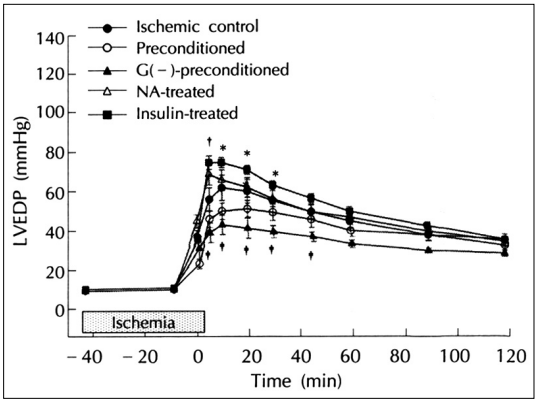

Fig. 4. Changes of the left ventricular end-distolic pressure (LVEDP) during ischemia and reperfusion. * : p<.05, † : p<0.01, ischemic control vs insulin-treated ; ‡ : p<0.05, ischemic control vs glucose-free [G(-)] preconditioned, analyzed by unpaired t-test.

Protein kinase C 활성도 변화

전체적인 PKC 활성도는 실험군 사이에서 차이가 없었으나, 세포질 분획 PKC 활성도의 분율은 기준선과 비교하여 IPC후, IPC와 45분 허혈후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후에 유의하게 감소하였다. 이와는 대조적으로 세포막 분획 PKC 활성도의 분율은 IPC후, IPC와 45분 허혈후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후에 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

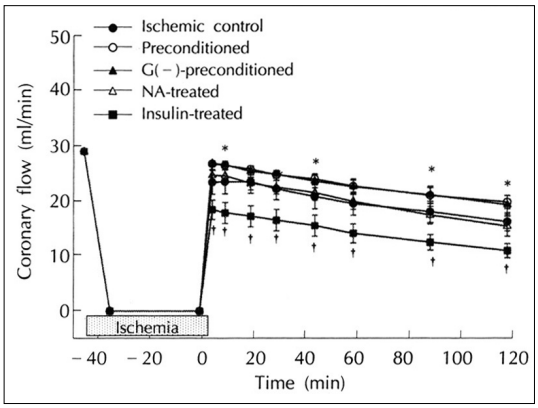

Fig. 5. Changes of the coronary flow during ischemia and reperfusion. * : p<0.05, ischemic control vs preconditioned ; † : p<0.05, ischemic control vs insulin-treated, analyzed by unpaired t-test.

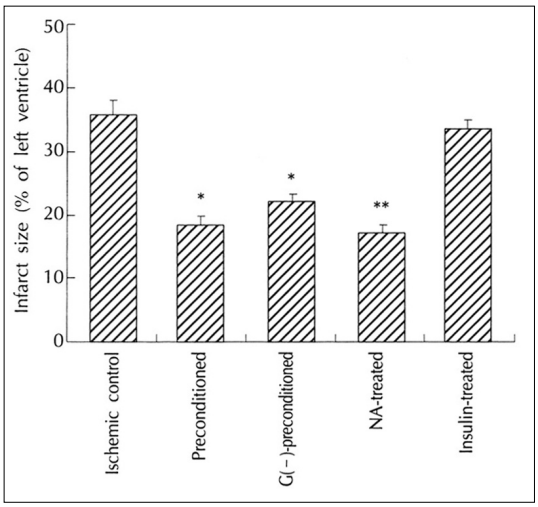

Fig. 6. Infarct size. Infarct size was significantly reduced by preconditioning, glucose-free [G(-)]-preconditioning, and sodium acetate treatment. * : p<0.05, † : p<0.01, vs ischemic control.

당원량의 변화

심근세포내 당원량은 기준선 값에 비하여 IPC후, glucose 결핍 전처치후, sodium acetate 투여후에 감소하였으나 허혈 대조군과 비교하여 IPC후나 glucose 결핍 전처치후 사이에는 차이가 없었으며, 인슐린을 투여하면 증가하였다. 또한 45분 허혈후에는 허혈 대조군

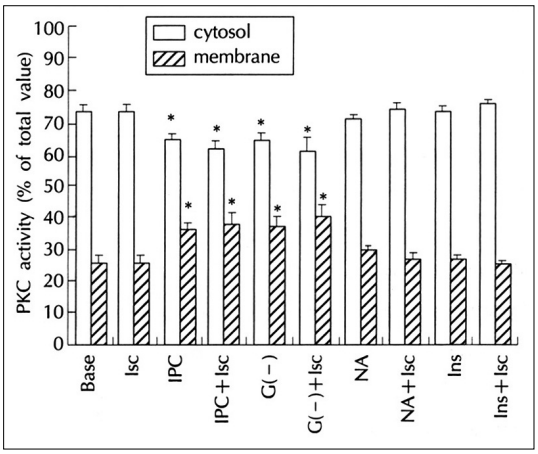

Fig. 7. PKC activity. Cytosol PKC activity decreased and membrane PKC activity increased after ischemic preconditioning (IPC), IPC and 45 min ischemia (Isc), glucose-free preconditioning [G(-)], and G (-) and 45 min ischemia. * : p < 0.05, vs baseline (Base).

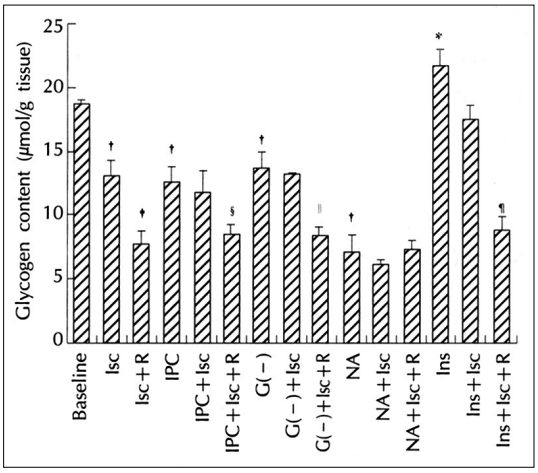

Fig. 8. Glycogen content in the cardiac myocytes. Glycogen content decreased after ischemic preconditioning, glucose-free [G(-)] preconditioning, and sodium acetate (NA) treatment ; it increased after insulin (Ins) treatment. However, glycogen content decreased after 120 min reperfusion (R) in all experimental groups. * : p<0.05, † : p<0.01, vs baseline ; ‡ : p<0.01, vs Isc ; § : p<0.05, vs IPC ; ‖ : p<0.01, vs G (-) ; ¶ : p<0.01, vs Ins.

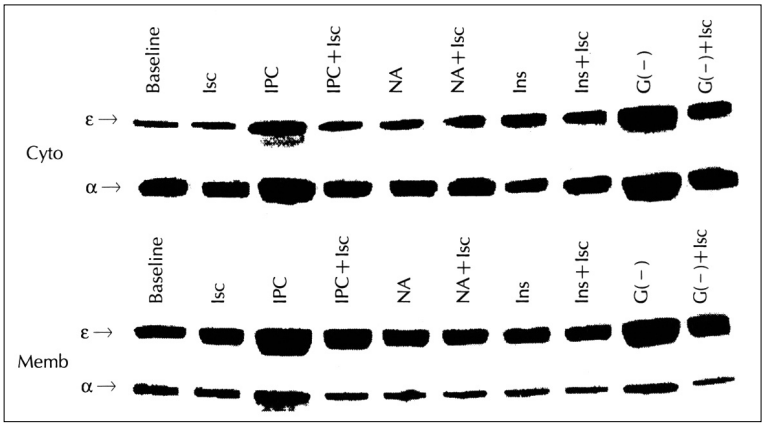

Fig. 9. Immunoblots of protein kinase C (PKC) isozymes. In the a isozymes, expression of the cytosolic fractions increased after ischemic preconditioning (IPC) and glucose-free preconditioning [G(-)]; expression of the membrane fractions increased after IPC. In the ε isozymes, cytosol fractions increased after IPC, G(-), and G(-) and 45 min ischemia (Isc); membrane fractions increased after IPC, IPC and Isc, G(-), and G(-) and Isc.

과 인슐린 투여군에서만 감소하였을 뿐 다른 실험군에서는 허혈전과 같았다. 120분 재관류후의 심근세포내 당원량은 실험군 사이에서 차이를 나타내지 않았다(Fig. 8).

Protein kinase C 동종효소에 대한 immunoblotting

본 실험에서는 PKC 중 α, β, δ, ε, ζ 등 다섯 가지의 동종효소에 대한 발현을 각각에 대한 단클론항체를 이용하여 Western blot으로 관찰하였다. 그 결과 β, δ, ζ 등에서는 유의한 변화가 없었던 반면 α 및 ε에서 양적인 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 9). PKC-α의 세포질분획은 기준선과 비교하여 IPC후, glucose 결핍 전처치후에 발현이 증가하는 경향을 나타내었으며, 세포막분획은 IPC후에만 증가하는 경향을 나타내었다. PKC-ε의 세포질분획은 기준선과 비교하여 IPC후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후에 발현이 증가하는 경향을 나타내었으며, 세포막분획은 IPC후, IPC와 45분 허혈후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후 증가하였다. 이상의 결과는 PKC-α 또는 ε, 특히 ε분획의 동종효소가 허혈성 전처치중이나 glucose 결핍 전처치 또는 전처치후 후속되는 허혈 기간중에 활성화되어 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였음을 나타내는 것이다.

고 찰

허혈성 전처치와 심근세포내 당원량 변화

흰쥐 심장을 glucose를 포함하지 않은 용액으로 관류하면 비교적 장시간 동안의 허혈에도 불구하고 심근세포내 산증의 전개가 저하되며,[20] 재관류시에도 심장기능 회복의 증가가 일어남이 관찰되었다.[21] 또한 Bailey 등[22]은 glucose와 인슐린을 투여하여 심근세포내의 당원 농도를 높여준 실험에서 허혈을 실시한 결과, 유산생산 증가, 세포내 산증 악화 등이 일어나며 이러한 현상은 심근세포내 당원량과 비례함을 관찰하였다. 이들에 의하면 허혈 기간 동안에는 당원 분해로 유산 생성이 증가되어 세포내 산증이 유발되며 이러한 변화들은 손상정도에 영향을 미치기 때문에, 역으로 심근세포내 당원이 결핍되도록 처리하면 심근세포 손상을 유발하는 일련의 반응의 저하로 손상 정도는 감소할 것이라고 추측하였다. 이상의 배경에서 Wolfe 등[14]은 IPC를 실시하면 장시간 동안의 허혈 전에 심근세포에서는 당원결핍이 일어나며 허혈 기간 중에도 당원량은 지속적으로 저하되고 세포내 산증도 현저하지 않음을 관찰하였다. 그들은 당원고갈로 나타나는 심근보호 효과는 당원결핍 정도에 비례하고 세포내 산증 완화를 수반하며 이러한 효과들은 심근의 산소 요구량이나 고에너지 인산분해 정도와는 무관하며 허혈로 고갈되었던 당원량의 회복정도와 심근보호 효과 소실정도는 비례하므로 심근세포내 당원결핍은 IPC의 발생기전과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각하였다. 흰쥐를 이용한 최근의 실험에서도 glucose나 유산을 투여하거나 허혈전에 심근세포내의 당원량을 증가시킨 경우에는 IPC를 실시했음에도 불구하고 물질대사나 심근 수축력의 회복은 현저히 저하되었다.[15]

본 실험 결과, 45분 허혈전 glucose 결핍 용액이나 sodium acetate를 투여하면 LVDP, 심근수축력(dP/dt) 등은 투여시작으로부터 서서히 감소하여 대체로 기준선 값의 80 85% 정도, 인슐린을 투여하면 초기에

는 일시적으로 증가하였다가 감소하여 기준선 값의 90% 정도, IPC군에서는 5분 허혈후 15분 재관류시 초기에는 일시적 증가후 기준선값의 85 90% 정도로 유지되는 경향을 나타내었으나 LVEDP와 관혈류는 실험군 사이에서 차이가 없었으며 45분 허혈 직전 이상의 기능척도들은 실험군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다(data now shown). 이러한 결과는 본 실험에서 실시한 전처치들이 적어도 전처치 기간동안에는 심근기능에 영향을 미치지 않음을 나타내는 것이다. 이와는 달리 45분 허혈후 재관류를 하면 IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군 등에서는 대체로 허혈 대조군과 비교하여 LVDP, 심근수축력(dP/dt) 등은 다소 증가하는 경향을 나타내었으며 관혈류에서는 실험군 사이에서 차이를 볼 수 없었고 특히 LVEDP에 있어서는 sodium acetate 투여군에서는 재관류 초기에 상승폭이 현저히 커지는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 인슐린을 투여한 실험군에서는 LVDP, 심근수축력, 관혈류 등이 모두 허혈 대조군에 비하여 현저히 감소하였으며 LVEDP의 상승폭도 크게 증가하였다. 이상으로 볼 때 인슐린을 투여한 실험군을 제외하면 허혈 대조군과 IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군 사이에서는 기능적으로 큰 차이가 없음을 알 수 있다. 그리고 45분 허혈후와 비교하여 IPC를 실시하거나 glucose 결핍 전처치를 실시하더라도 심근세포내 당원량에는 차이가 나지 않으며 sodium acetate를 투여한 경우 또는 인슐린을 투여한 경우에 심근세포내 당원량이 현저히 저하하거나 증가함을 볼 수 있고 120분 재관류 후에는 실험군 사이에서 차이가 없었다. 그러나 심근경색 크기는 허혈 대조군(35%)과 비교하여 인슐린 투여군에서는 33%로 큰 차이가 없었으나 IPC군, glucose 결핍 전처치군, sodium acetate 투여군에서는 각각 19, 22, 16%로 감소하여 허혈 대조군 및 인슐린 투여군과는 큰 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 glucose 결핍 전처치를 실시할 경우 허혈후 재관류시 2시간 이내에는 기능적인 회복에 있어서 영향을 미치지 못하나 심근경색 범위가 현저히 감소하는 보호효과가 있음을 나타내는 것이다. 경색크기와 심근세포내 당원량의 변화를 보면 sodium acetate를 투여한 경우 당원량과 경색 크기 모두 크게 감소하여 두 변량 사이에 상관관계가 있는 것으로 볼 수 있으나, 당원량은 IPC, glucose 결핍 전처치후에 감소하는 경향을 나타내었을 뿐 허혈 대조군과 비교하여 차이가 없었고 45분 허혈후에는 허혈 대조군과 인슐린 투여군에서만 허혈전에 비하여 감소하였으며 다른 실험군에서는 허혈전과 거의 같은 수준으로 유지되었고, 120분 재관류후에는 전 실험군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었으므로 심근세포내 당원량 만으로 IPC나 glucose 결핍 전처치의 심근보호효과를 설명하기는 어렵다. King과 Opie[23]는 IPC의 효과를 얻기 위해서는 일정량의 당원이 필요하다고 기술하고 있으나 Asimakis[24]는 흰쥐의 적출 심장으로 실험한 결과 IPC 유무에 관계없이 허혈전의 심근세포내 당원량에는 커다란 차이가 없었으나 IPC를 실시하면 재관류시 심근기능의 회복 증가를 관찰할 수 있었기 때문에 심근세포내 당원 결핍만으로 IPC의 발생기전을 설명할 수 없다고 한 것은 본 연구자들의 견해와 일치한다. 따라서 단순히 당원 결핍만으로 IPC의 발생기전을 설명하기에는 논란의 여지가 있다.

Glucose 결핍 전처치와 protein kinase C

본 실험 결과, 세포질 분획 PKC 활성도는 IPC후, IPC와 45분 허혈후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후에 유의하게 감소하였으며 세포막 분획의 PKC 활성도는 IPC후, IPC와 45분 허혈후, glucose 결핍 전처치후, glucose 결핍 전처치와 45분 허혈후에 유의하게 증가하였다. 이와는 달리 sodium acetate나 인슐린을 투여한 경우에는 기준선 값이나 허혈 대조군에 비하여 큰 변화가 없었다. 이상의 결과는 glucose 결핍 전처치에 의한 심근경색 크기 감소효과와 PKC 활성화와 일부 관계 있음을 시사하는 것이나 기대하였던 바와는 달리 sodium acetate를 투여한 경우 PKC 활성도에 변화가 일어나지 않은 것은 심근세포내 당원량과 PKC 활성도 사이에는 유의할만한 관련성이 없음을 나타내는 것이다.

Protein kinase의 기능에 대해서는 완전히 이해되고 있지 않으나 세포의 종류에 따라 특이적이며 생체내에 존재하는 여러 가지 활성물질과 반응하여 신호전달 체계에서 부분적으로 역할하는 것으로 알려져 있다. 심근세포에서는 A_1 아데노신 수용기와 G protein이 결합하여 phospholipase C가 활성화되면 세포막을 구성하는 인지질이 분해되어 diacylglycerol(DAG)가 형성되며 DAG는 다시 PKC를 활성화하여, 이로부터 최종 작용체일 것으로 추측되는 key protein의 인산화가 일어나

세포막의 통합성이 유지되는 것으로 알려져 있다.[7] Yt-rehus 등[8]은 PKC 활성억제제 staurosporine을 투여하면 심근경색 크기 감소효과가 소실되며 PKC 활성촉진제인 4β-phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)를 투여하면 경색크기가 감소됨을 관찰하고 PKC 활성화는 IPC 효과 발생과 중요한 관계가 있을 것으로 추측하였다. 이들은 IPC에 따라 심근세포 세포막에 있는 아데노신 수용기 점유가 일어나며 다음 단계로 PKC 활성화가 일어나 이온통로, 미세관(microtubule) 등 단백질 효과기의 인산화가 일어나고 이로부터 심근수축력 증가가 수반되므로서 심근보호 효과가 나타난다고 하였다. 이와 함께 인산효소 차단제 okadaic acid를 사용하여 단백질로 이루어진 효과기들을 인산화시킴으로서 심근보호 효과가 나타남을 관찰하였으며,[25] Downey 등[7]도 미세관 활동을 억제하는 colchicine을 사용하여 IPC효과가 차단됨을 관찰하여 PKC와 허혈성 전처치 사이의 관련성은 확인된 바 있다.

본 실험에서 IPC군이나 glucose 결핍 전처치군에서 세포질 분획의 PKC는 감소한 반면 세포막 분획 특히 ε 동종효소가 증가한 것은 IPC나 glucose 결핍 전처치에 의한 반응으로 PKC-ε이 활성화되어 세포질에서 세포막으로 이동하였음을 나타내는 것이다. 따라서 IPC나 glucose 결핍 전처치를 실시할 경우 비활성 PKC가 세포막과 같은 활동성이 큰 세포소기관에서 활성화되어 세포막에 존재하는 효과기들의 활성화에 관계하는 것으로 판단된다. 그러나 개를 이용한 실험에서는 PKC활성 촉진제를 투여하더라도 경색범위의 정도에 변화가 관찰되지 않았으며,[26] 돼지에서는 PKC 활성차단제를 사용했음에도 오히려 경색범위의 감소가 관찰되었다.[27] 이와 같이 본 실험 결과와는 상반된 결과가 나타난 것은 IPC에 따라 PKC는 활성화되었으나 key protein의 인산화에는 영향을 미치지 못하였거나, 세포막 분획 PKC의 총량은 증가하였음에도 특이적인 PKC 동종효소의 발현이 심근세포 보호에 관여할 수 있을 정도로 크지 않았던지, 또는 IPC유도 방법 자체로 재관류시 PKC 등 분자생물학적인 인자보다는 기계적인 인자에 의한 심근기절현상 때문에 나타난 결과임을 배제하기 어렵다. 이상을 종합하면 PKC가 IPC효과와 관련성이 있음은 부인하기 어려우나 모든 포유동물에서 공통적으로 관여하는 기전은 아닐 가능성도 있다.

이상으로 적출 관류 토끼 심장에서 허혈성 전처치의 심근보호 효과와 심근세포내 당원량 사이에는 관련성이 크지 않으며 장시간 동안의 허혈전에 glucose 결핍 용액을 투여하여 전처치하면 허혈후 재관류시 심근기능의 회복증가는 기대하기 어려우나 IPC와 유사한 심근경색 범위 감소효과가 있고 이러한 효과는 적어도 일부에서 PKC 특히 ε 동종효소의 활성화와 관계있을 것으로 생각된다.

요 약

연구목적 :

심근세포의 에너지원인 당원의 고갈 또는 당대사 증가와 유산의 심근세포내 축적은 허혈 심근세포 손상의 중요한 원인으로 알려져 있으나 짧은 기간 동안 허혈-재관류를 반복(허혈성 전처치, IPC) 할 경우 이는 일시적으로 심근세포내에서 당원고갈을 일으킴으로서 보호효과가 나타나는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서는 허혈성 전처치와 당원량의 변화 사이의 관계를 알아보고자 하였다.

실험방법 및 결과 :

Langendorff방법에 따라 관류하여 전체 허혈(5분)-재관류(10분) 1회 실시로 허혈성 전처치를 유도하고 45분 전체 허혈 후 120분 재관류하였다(IPC군). 허혈 대조군에서는 허혈성 전처치없이 45분 전체 허혈 후 120분 재관류하였다. Glucose 결핍 전처치군에서는 glucose를 포함하지 않은 관류액으로 5분 관류한 후 표준 관류액으로 10분 관류하고 45분 허혈 실시후 120분 재관류하였다. 심근세포내에서 당원의 uptake가 억제되어 나타나는 결과를 보기 위한 sodium acetate 투여군에서는 glucose가 포함되지 않은 5 mM의 sodium acetate가 포함된 관류액으로 15분 관류한 후 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 심근세포내에서 당원의 uptake가 증가되어 나타나는 결과를 보기 위한 인슐린 투여군에서는 관류액 1 l당 1 unit의 인슐린이 포함된 관류액으로 15분 관류한 후 45분 허혈후 120분 재관류하였다. 45분 허혈후 LVDP, 심근수축력, 관혈류 등의 회복율은 허혈 대조군에 비하여 sodium acetate를 투여한 경우에는 큰 변화가 없었으며 IPC나 glucose 결핍 전처치후에 증가하는 경향을 나타내었으나 인슐린을 투여한 경우에는 저하되었다. 경색 크기는 허혈 대조군과 비교하여 인슐린 투여군에서는 차이가 없었으

나 허혈성 전처치군, glucose 결핍 전처치군에서 감소하였으며 특히 sodium acetate 투여군에서 가장 작았다. 세포질 분획 PKC 활성도는 허혈성 전처치군, glucose 결핍 전처치군에서 감소하였으며 세포막 분획의 PKC 활성도는 증가하였으나 다른 실험군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. PKC 동종효소중 특히 세포막 분획의 ε은 IPC나 glucose 결핍 전처치후에 증가하였다. 심근세포내 당원량은 기준선 값에 비하여 45분 동안 허혈후, IPC후, glucose 결핍 전처치후, sodium acetate 투여후에 감소하였으나 인슐린을 투여하면 증가하였다. 또한 120분 동안 재관류후에는 sodium acetate를 투여군을 제외한 모든 실험군에서 재관류전과 비교하여 감소하였으나 실험군 사이에서 차이는 나타나지 않았다.

결 론:

이상으로 적출 관류 토끼 심장에서 IPC에 의한 심근보호 효과와 심근세포내 당원량과의 관계는 크지 않은 것으로 생각되며 glucose 결핍 용액 투여로 전처치할 경우 후속된 장시간 동안의 허혈에 대하여 좌심실기능 회복 증가는 기대할 수 없으나 심근경색 범위가 감소되거나 한정되는 보호효과가 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 보호효과는 일부에서 세포막 분획 PKC 특히 ε 동종효소의 활성화와 관계있는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 세포내 당원 · 심근보호 · 토끼 심장 · 허혈성 전처치 · PKC.

REFERENCES

1) Hearse DJ, Yellon DM. *Why are we still in doubt about infarct size limitation? The experimentalist's view point. In: Hearse DJ, Yellon DM, editors. Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation. New York: Raven Press;1984. p.17-41.*
2) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.*
3) 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.*
4) Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. Circ Res 1990;66:1133-42.*
5) Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Kamada T. *Augumentation of adenosine production during ischemia as a possible mechanism of myocardial protection in ischemic preconditioning. Circulation 1991;84(Suppl Ⅱ): Ⅱ-306.*
6) Li Y, Kloner RA. *The cardioprotective effects of ischemic ' pre-conditioning ' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. Circulation 1993;87:1642-6.*
7) Downey JM, Liu Y, Ytrehus K. *Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning. In: Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM, editors. Ischemic Preconditioning. The Concept of Endogenous Cardioprotection. Boston: Kluwer;1994. p.137-52.*
8) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol 1994;266:H1145-H1152.*
9) Kim DJ, Kim H, Park JI, Shim TS, Rah BJ, Kim HD. *Relation between ischemic reconditioning and the duration of sustained ischemia. J Korean Med Sci 1995;10: 121-31.*
10) Cohen MV, Liu GS, Downey JM. *Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. Circulation 1991; 84:341-9.*
11) Gross GJ, Auchampach JA. *Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circ Res 1992;70:223-33.*
12) Kim H, Kim DJ, Kim SS, Rah BJ, Kim HD. *The cardioprotective effect of ischemic preconditioning: Role of adenosine and protein kinase C. Korean Circulation J 1997;27:1004-16.*
13) Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. *Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol 1994;26:661-8.*
14) Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FLJ, Donnelly TJ. *Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. Circulation 1993;87:881-92.*
15) Soares PR, de Albuquerque CP, Chacko VP, Gerstenblith G, Weiss RG. *Role of preischemic glycogen depletion in the improvement of postischemic metabolic and contractile recovery of ischemia-preconditioned rat hearts. Circulation 1997;96:975-83.*
16) Henning SL, Wambolt RB, Schonekess BO, Lopaschuk GD, Allard MF. *Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. Circulation 1996;93:1549-55.*
17) 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.*
18) Dietrich K, Karl D. *Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Methods of Enzymatic Analysis. San Diego: Academic Press;1974. p.1127-31.*
19) Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970; 227:681-5.*
20) Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ. *Studies of acidosis in the ischemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. Biochem J 1979;184:547-54.*
21) Neely JR, Grotyohann LW. *Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. Circ Res 1984;55:816-24.*
22) Bailey IA, Radda GK, Seymour A-ML, Williams SR. *The*

effects of insulin on myocardial metabolism and acidosis in normoxia and ischaemia. Biochim Biophys Acta 1982; 720:17-27.

23) King LM, Opie LH. *Does preconditioning act by glycogen depletion in the isolated rat heart? J Mol Cell Cardiol 1996;28:2305-21.*

24) Asimakis GK. *Myocardial glycogen depletion cannot explain the cardioprotective effects of ischemic preconditioning in the rat heart. J Mol Cell Cardiol 1996;28:563-70.*

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) 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.*

27) Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. *Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig heart in vivo. Circulation 1994;90 (Suppl I):I-647.*