

# 유리 활성 산소가 흰쥐 심근의 ATP-민감성 칼륨통로 활성에 미치는 영향

전남대학교병원 심장센터 순환기내과,<sup>1</sup> 전남대학교 의과대학 약리학교실,<sup>2</sup> 전남대학교 의과대학 연구소<sup>3</sup>

박형욱<sup>1</sup> · 주정민<sup>2</sup> · 박옥영<sup>1</sup> · 박우석<sup>1</sup> · 김주한<sup>1</sup> · 김 원<sup>1</sup>

안영근<sup>1</sup> · 정명호<sup>1,3</sup> · 박종춘<sup>1,3</sup> · 김재하<sup>2,3</sup> · 강정채<sup>1,3</sup> · 조정관<sup>1,3</sup>

## Effects of Oxygen Free Radicals on K<sub>ATP</sub> Channel Activity in Mouse Cardiac Myocytes

Hyung Wook Park, MD<sup>1</sup>, Jeong Min Ju, PhD<sup>2</sup>, Ok Young Park, MD<sup>1</sup>, Woo Seok Park, MD<sup>1</sup>,

Joo Han Kim, MD<sup>1</sup>, Weon Kim, MD<sup>1</sup>, Young Keun Ahn, MD<sup>1</sup>, Myung Ho Jeong, MD<sup>1,3</sup>,

Jong Chun Park, MD<sup>1,3</sup>, Jae Ha Kim, MD<sup>2,3</sup>, Jung Chae Kang, MD<sup>1,3</sup> and Jeong Gwan Cho, MD<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Division of Cardiology, The Heart Center of Chonnam University Hospital, <sup>2</sup>Department of Pharmacology,

<sup>3</sup>Chonnam National University Medical School and The Research Institute of Medical Sciences,

Chonnam National University, Gwangju, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objective :** Oxygen-derived free radicals (OFRs), produced as myocardium is reperfused after ischemic injury, contribute to reversible and irreversible cellular injury. K<sub>ATP</sub> channels, activated by ischemia, have been reported to participate in the arrhythmogenic response to acute myocardial ischemia. Therefore, we examined the effects of OFRs on the regulation of K<sub>ATP</sub> channel activity. **Materials and Methods :** Isolated mice (ICR) hearts were perfused with Tyrode's solution on a Langendorff apparatus. Single ventricular myocytes were isolated using enzymatic digestion with collagenase and protease. Single channel currents in the inside-out patch mode were recorded. OFRs were applied by mixing hypoxanthine and xanthine oxidase. The currents were recorded in the patch membrane at a holding potential of -60 mV. **Results :** OFRs generated by 0.1 U/mL xanthine oxidase and 0.5 mM hypoxanthine had no effects on the activities of K<sub>ATP</sub> channels before and after treatment with 200  $\mu$ M ATP. OFRs generated with 0.2 U/mL xanthine oxidase and 1.0 mM hypoxanthine reactivated the channel activities which had been attenuated by 100  $\mu$ M ATP. In the presence of 100 U/mL superoxide dismutase and 122 U/mL catalase, which are OFRs scavengers, OFRs did not affect the K<sub>ATP</sub> channels activities. **Conclusion :** OFRs generated by the reaction of hypoxanthine and xanthine oxidase increased the K<sub>ATP</sub> channel activities in the inside-out patch. (Korean Circulation J 2003;33(12):1140-1146)

**KEY WORDS :** Oxygen free radicals ; ATP-sensitive potassium channel.

### 서 론

우리나라에서 관상동맥질환은 최근 20여년 동안에 급

격히 증가하여 비외상성 사망의 가장 흔한 원인 질환의 하나가 되었다. 관상동맥질환은 임상적으로 협심증, 심근 경색증, 돌연사, 허혈성 심근증 등으로 표현되며 관상동

논문접수일 : 2003년 6월 18일

심사완료일 : 2003년 8월 29일

교신저자 : 조정관 501-757 광주광역시 동구 학1동 8번지 전남대학교병원 순환기내과

전화 : (062) 220-6242 · 전송 : (062) 228-7274 · E-mail : chojg@unitel.co.kr

백질환 환자에서 돌연사의 기전으로 여러 가지 원인이 제시되고 있으며, 급격한 관상동맥의 폐쇄에 의해 초래된 급성 심근허혈에 의해 심실빈맥 또는 심실세동이 발생하고 이로 인한 심기능의 마비가 한 요인이 된다고 알려져 있다.

급성 심근허혈 시 돌연사의 원인이 되는 심실빈맥이나 심실세동이 발생하는 데에는 심근허혈 시 유리되는 활성 산소(oxygen free radicals), 유리 지방산(free fatty acid), 혈소판에서 분비되는 thromboxane, 교감신경계 자극에 의해 분비된 catecholamine과 같은 체액성 물질, Na 및 K 통로와 같은 이온 통로의 기능 변화에 의한 Na-K 세포내외 농도 구배의 변화 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다.<sup>1)</sup>

ATP(adenosine triphosphate) 민감성 칼륨통로( $K_{ATP}$  channel)는 세포내 ATP 농도에 의해서 그 활성이 조절되는 이온 통로로서 1983년 Noma<sup>2)</sup>에 의해서 처음으로 발견되었는데 세포내 ATP 농도가 어느 한계 이하로 떨어질 때 활성화되고 ATP 농도가 어느 한계 이상으로 높아질 때 억제된다.<sup>3)</sup>  $K_{ATP}$  통로는 세포내 에너지가 고갈되는 심근허혈 시 활성화되어 재분극 시간을 단축시켜 심근의 산소 요구를 감소시킴으로써 허혈성 손상으로부터 심근을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 그 동안의 연구 결과에 의하면  $K_{ATP}$  통로는 세포내 ATP 농도뿐만 아니라 세포막에서 유리된 인지질(phospholipid)이나 이들의 분해산물인 arachidonic acid나 linoleic acid와 같은 유리지방산(free fatty acid)과 lysophospholipid, prostaglandin, nitric oxide(NO) 등에 의해서도 그 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다.<sup>5-7)</sup>

활성 산소는 심근허혈이나 재관류 시 xanthine oxidase 경로나 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 경로 등에 의해 대량으로 생성된다.<sup>8,9)</sup> 이렇게 해서 생성된 활성 산소는 재관류 시 발생하는 재관류 부정맥(reperfusion arrhythmia)과 재관류 후 지속되는 심근 수축기능 이상 즉, 심근 기절(myocardial stunning)의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>10-13)</sup>

이전의 연구 결과로 활성 산소가 허혈 심근의 전기생리학적 특성이나 수축기능의 변화를 일으키는 것이 밝혀졌고 여기에  $K_{ATP}$  통로가 관여할 것으로 추정되고 있지만 아직까지 확실하게 규명되지 않은 상태이다. 본 연구는  $K_{ATP}$  통로와 심근허혈 및 재관류 시 대량으로 생성

되는 활성 산소와의 관계를 밝히고자 시행되었다.

## 재료 및 방법

### 단일 심실근 세포의 분리

실험에는 체중 25 g 내외의 ICR 계의 수컷 mouse를 사용하였다. Mouse를 경추 탈구법으로 실신시킨 후, 흉강을 열고 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 4℃의 Tyrode 용액 내에서 실체 현미경 하에서 미세가위로 주변 결합조직과 지방조직을 제거하고, 대동맥에 카테타를 삽입한 후 결찰 하여 Langendorff 장치에 매달고 37℃의 Tyrode 용액을 관상동맥을 통해 1.5 mL/min의 속도로 5분간 관류시켰다. 이어서  $Ca^{2+}$ -free Tyrode 용액을 심장박동이 멈출 때까지 관류시키고 심장이 완전히 이완되면 0.6 mg/mL의 collagenase(CLS2, Worthington Biochemical Co.)와 0.15 mg/mL의 protease(Sigma, type XIV)를 함유한  $Ca^{2+}$ -free Tyrode 용액을 약 25분간 관류시킨 다음, 마지막으로 고  $K^+$ , 저  $Cl^-$  용액을 5분간 관류시켜 심장 내에 남아있는 효소를 제거시켰다. 소화된 심장으로부터 심실을 떼어내어 고  $K^+$ , 저  $Cl^-$  용액에 넣고 여러 조각으로 자른 다음 pipette으로 가볍게 기계적 자극을 주어 단일 심실근 세포로 분리하였다. 분리된 세포들을 고  $K^+$ , 저  $Cl^-$  용액에 보관한 후 도립현미경(American Optical Co.)상에서 막대 모양의 가로무늬가 분명하며 윤곽이 뚜렷하고 움직임이 없는 세포들만 골라 실험에 사용하였다.

### 미세전극의 제작

Patch clamp 용 미세전극은 내경 1.5 mm의 borosilicate 유리관(PG150T-7.5, Clark Electromedical Instruments Co., USA)을 미세전극제작기(2-stage pipette puller, PP-83, Narishige)를 이용하여 저항이 4-5 MΩ 정도 되게 뽑은 후, 실체 현미경(stereozoom microscope, SMZ-2B, Nikon) 하에서 미세전극 말단 근처 부위까지 Sylgard(Corning Co.)를 도포한 후 가열된 니크롬선 하에서 건조시켰다. 이렇게 만들어진 미세전극의 말단을 다시 광학현미경(Microforge, MF-83, Narishige)하에서 500배로 관찰하면서 전극 말단부에 열을 가하여 다듬은 다음 저항이 5 MΩ 정도 되는 전극을 실험에 사용하였다.

## 단일통로 전류 측정 및 분석

단일통로 전류는 gigaohm-seal patch clamp 방법 중 excised inside-out patch 기법을 사용하여 기록하였다. Patch clamp 증폭기(Axopatch 1D, Axon Instruments Inc.)를 통하여(cut-off frequency : 2 kHz) 측정된 전기적인 신호는 디지털 신호기록기(digital data recorder, VR-10B, Instrutech Co.)를 거쳐 비디오테이프(SV-14D, Samsung)에 기록하였다. 단일통로 전류의 분석은 비디오테이프에 기록된 자료를 재생하고 A/D 변환기인 Digidata 1200 interface(Axon Instruments Inc.)로 변환시킨 다음 pClamp 프로그램(Axon Instruments Inc.)을 이용하여 컴퓨터에 저장하고 분석하였다. 단일통로의 열리고 닫히는 시간은 half-maximum single-unit amplitude threshold를 이용하여 산출하였다.

## 실험용액

단일 심실근세포를 분리하는 데에는 Tyrode 용액(조성 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 0.33 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, pH는 NaOH를 사용하여 7.4로 조정)을 사용하였다.

단일 심실근세포의 저장에는 고  $K^+$ , 저  $Cl^-$  용액(조성 : 20 mM taurine, 70 mM glutamic acid, 25 mM KCl, 10 mM  $KH_2PO_4$ , 3 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, KOH로 pH를 7.35로 조정)을 사용하였다.

단일통로 전류의 측정을 위한 internal 및 pipette 용액으로는 K-5 용액(조성 : 140 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM EGTA 및 10 mM HEPES, pH는 HCl로 7.2로 조정)을 사용하였다.

## 실험약물

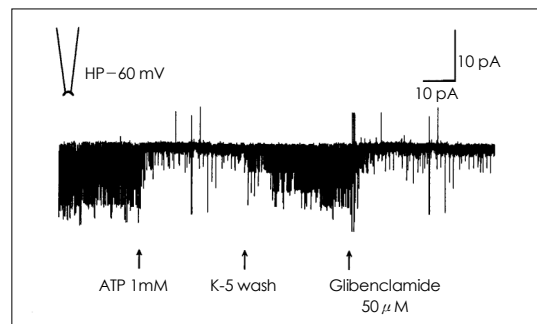
실험약물로는 adenosine triphosphate(ATP, Sigma), glibenclamide(Sigma), hypoxanthine(Sigma)과 xanthine oxidase(Sigma), superoxide dismutase(Sigma)와 catalase(Sigma) 등을 사용하였다.

## 결 과

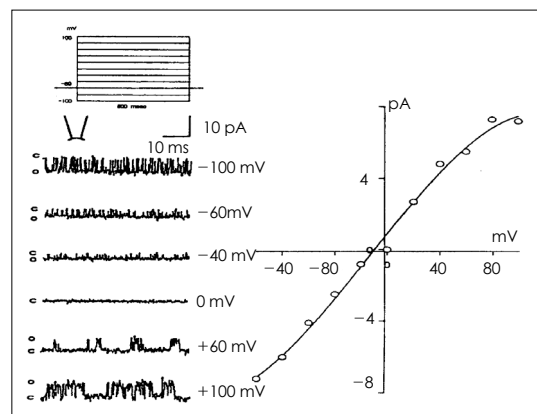
### $K_{ATP}$ 통로 활성의 특성

단일 심실근 세포에서  $K_{ATP}$ 통로 활성의 특성을 알아

보고자 K-5 용액 관류하에서 excised inside-out patch를 만들고  $-60$  mV의 유지전위(holding potential)를 가하면 내향성 전류의 통로 활성이 나타났다. 이때  $100 \mu M$  ATP를 세포내액(K-5 용액)에 첨가하면 통로 활성이 점차 약화되어 1분 경과 시에는 활성이 거의 나타나지 않았다. 세포 내액을 ATP가 없는 원래의 실험용액으로 관류시키면 통로 활성이 다시 나타나기 시작하여 3분 경과 시에는 거의 excised inside-out patch 시행 직후와 비슷한 수준의 통로 활성을 유지하였다(Fig. 1). 통로 활성의 전압-전류 관계를 알아보려고 inside-out



**Fig. 1.** Identification of  $K_{ATP}$  channel and effects of ATP and glibenclamide on  $K_{ATP}$  channel activity recorded from an excised inside-out patch at  $-60$  mV holding potential. The channel activity appears immediately after making inside-out patch and ATP (1 mM) inhibits the channel activity almost completely. The channel activity reappears after washing ATP from the bath solution, and the glibenclamide  $50 \mu M$  also inhibits the channel activity. ATP: adenosine triphosphate.

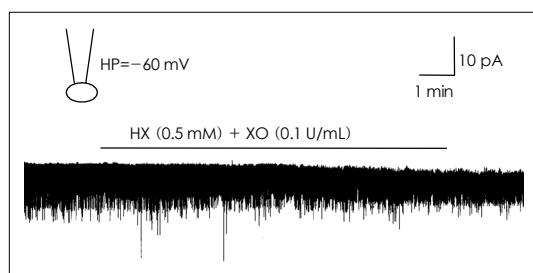


**Fig. 2.** Current-voltage relationship of the ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) activities. Recordings were obtained from excised inside-out patch of isolated mouse ventricular myocytes at different clamp potentials ranging from  $-100$  to  $+100$  mV (left panel). The current-voltage relationship (right panel) was plotted with the single channel currents from the left panel. ATP: adenosine triphosphate.

patch 시행 후, 통로 활성이 안정화 되었을 때, 막전압을  $-100$  mV부터  $20$  mV 간격으로  $+100$  mV까지 증가시키면서 통로 전류를 측정하여, 전류-전압 상관관계를 계산하였다(Fig. 2). 이때 전류는 외향전류가 내향전류보다 작게 기록되는 내향정류성(inward rectification)을 보였으며, 전류-전압 상관관계 곡선으로부터 구한 slope conductance는 약  $62$  pS이었다. 전류의 크기는  $-60$  mV에서 평균  $3.7$  pA를 나타냈고 한 개의 통로가 열려 있는 dwell time과 통로 활성의 정도는 반비례 관계였다. 이상의 통로 특성으로 보아 본 연구에 사용된 excised inside-out patch에서의 통로 활성은 ATP-민감성 칼륨( $K_{ATP}$ )통로 활성임이 확인되었다.

#### 유리 활성산소가 $K_{ATP}$ 통로 활성에 미치는 영향

Excised inside-out patch를 시행한 직후  $-60$  mV의 유지전위 상태에서 나타난  $K_{ATP}$  통로 활성에 미치는 유리 활성 산소의 영향을 알아보기로 0.1 U/mL xanthine oxidase와 0.5 mM hypoxanthine을 혼합하여 투여하였으나 통로의 활성에는 영향을 주지 못하였다(Fig. 3). Excised inside-out patch 시행 직후에는 세포내 ATP가 거의 없어  $K_{ATP}$  통로 활성이 최대로 나타날 것 이므로 통로 활성을 증가 시키는 약물의 효과는 은폐되어 나타나지 않을 수 있다. 따라서 유리 활성 산소가  $K_{ATP}$  통로 활성을 증가시킬 수 있는지를 알아보기로 excised inside-out patch 시행 후 세포 내액에 ATP( $200 \mu\text{M}$ )를 투여해서 통로 활성을 약화시킨 후, 0.1 U/mL xanthine oxidase와 0.5 mM hypoxanthine을 혼합 투여 하였으나 약화된  $K_{ATP}$  통로의 활성이 증가하지 않았다(Fig. 4). 이번에는 ATP의 농도를  $100 \mu\text{M}$ 로 낮추어

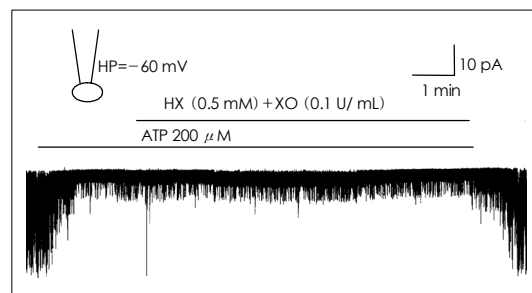


**Fig. 3.** Effect of OFRs (0.5 mM HX, 0.1 U/mL XO) on  $K_{ATP}$  channel activity in excised inside-out patch at  $-60$  mV holding potential. OFRs did not affect  $K_{ATP}$  channel activity in the ATP-free bath (intracellular side) solution. HX : 0.5 mM, XO : 0.1 mM. OFRs : oxygen-derived free radicals, ATP : adenosine triphosphate.

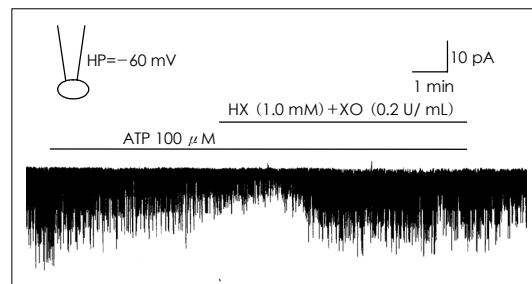
ATP에 의한 통로 억제 정도의 정도를 완화시키고, 유리 활성 산소를 생성시키기 위한 xanthine oxidase와 hypoxanthine의 농도를 두 배로 하여 그 효과를 측정하였다. 1.0 mM hypoxanthine의 존재 하에 0.2 U/mL xanthine oxidase 투여하였더니  $K_{ATP}$  통로의 활성이 다시 증가하였다(Fig. 5).

#### 유리 활성 산소의 $K_{ATP}$ 통로 활성 증가 효과에 미치는 free radical scavenger의 영향

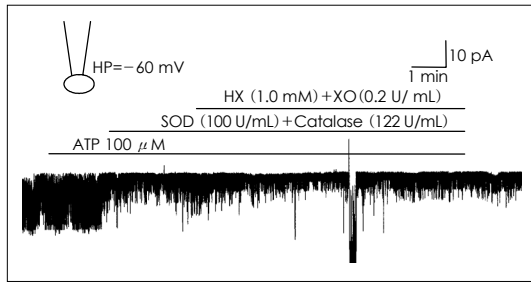
$K_{ATP}$  통로의 재활성화가 hypoxanthine과 xanthine oxidase의 반응에 의해 생성된 활성 산소에 의한 영향인지를 확인하기 위하여 유리 활성 산소 포착제인 superoxide dismutase와 catalase가 xanthine oxidase와 hypoxanthine 혼합 투여에 의한  $K_{ATP}$  통로 활성 증가 효과에 미치는 영향을 조사하였다. Inside-out patch



**Fig. 4.** Effect of OFRs (0.5 mM HX, 0.1 U/mL XO) on  $K_{ATP}$  channel activity in the presence of  $200 \mu\text{M}$  ATP in excised inside-out patch at  $-60$  mV holding potential. OFRs did not show any effects on  $K_{ATP}$  channel activity which were attenuated by  $200 \mu\text{M}$  ATP. HX : 0.5 mM, XO : 0.1 mM. OFRs : oxygen-derived free radicals, ATP : adenosine triphosphate.



**Fig. 5.** Effect of OFRs (1.0 mM HX, 0.2 U/mL XO) on  $K_{ATP}$  channel activity in the presence of  $100 \mu\text{M}$  ATP in excised inside-out patch at  $-60$  mV holding potential. OFRs reactivated  $K_{ATP}$  channel activities that were attenuated by  $100 \mu\text{M}$  ATP. HX : 1.0 mM, XO : 0.2 U/mL. OFRs : oxygen-derived free radicals, ATP : adenosine triphosphate.



**Fig. 6.** Effect of OFRs (1.0 mM HX, 0.2 U/mL XO) on  $K_{ATP}$  channel activity in the presence of 100  $\mu$ M ATP in excised inside-out patch at -60 mV holding potential. OFRs did not reactivate the attenuated  $K_{ATP}$  channel that were treated by prior application of scavengers (100 U/mL SOD, 122 U/mL Catalase) of OFRs. HX : 1.0 mM, XO : 0.2 U/mL. OFRs : oxygen-derived free radicals, ATP : adenosine triphosphate.

시행 후 100  $\mu$ M ATP 존재하에서 hypoxanthine (1.0 mM)과 superoxide dismutase (100 U/mL), catalase (122 U/mL)를 전처치한 후 xanthine oxidase (0.2 U/mL)를 투여하였더니 활성산소 포착제를 전처치 하지 않은 경우와는 달리  $K_{ATP}$  통로의 활성은 증가하지 않았다 (Fig. 6).

## 고 찰

$K_{ATP}$  통로는 Inoue 등에 의해 최초로 세포막과 미토콘드리아 내막에 존재한다는 것이 밝혀졌다.<sup>14)15)</sup>

심근허혈 시  $K_{ATP}$  통로는 심근의 허혈성 손상의 예방뿐 아니라 허혈-재관류 손상과 허혈 전조전(ischemic preconditioning)에도 관여하고 심근허혈 시 동반되는 심근세포의 전기생리학적 특성의 변화와 부정맥의 발생에도 기여하는 것으로 보고 된 바 있다.<sup>16-18)</sup>

본 연구에서 세포막에 있는  $K_{ATP}$  통로를 유리 활성 산소가 활성화시키는 것을 확인하였다. 이는 세포막에 있는  $K_{ATP}$  통로의 활성 증가로 인해 활동 전위 기간이 단축되고 불응기가 감소됨으로써 재관류 부정맥의 발생에 관여할 가능성을 시사해주는 결과이다.

$K_{ATP}$  통로는 그 활성이 세포내 에너지원인 ATP의 농도에 따라서 조절되는데, 정상 상태에서는 닫혀 있다가 허혈 상태 또는 대사 억제 상태에 놓이게 되면 세포내 ATP의 농도가 어느 한계점 이하로 감소하거나 세포내 ATP/ADP 농도 비가 낮아져 통로의 활성이 증가하게 된다.<sup>19)</sup> 본 연구에서 ATP의 농도가 200  $\mu$ M일 때 투

여한 유리 활성 산소가  $K_{ATP}$ 통로 활성화에 영향을 주지 못하였으나, ATP의 농도를 100  $\mu$ M로 하였을 때는 통로의 활성이 다시 증가된 것은 심근세포가 심각한 허혈 상태에 빠져 ATP의 농도가 어느 한계점 이하로 되기 이전에는  $K_{ATP}$  통로가 활성화 되지 않고 허혈이 심해질수록 통로의 활성이 강화되며 주로 괴사 주변부 허혈 심근조직에서  $K_{ATP}$  통로가 활성화되는 것으로 생각된다.

이 통로가 활성화 되면 칼륨이온의 세포외 배출 ( $K^+$  efflux)이 촉진되어 탈분극 후 재분극이 되기까지의 활동전위 기간이 단축되어 허혈심근의 수축력을 감소시켜 과부하로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.<sup>20)21)</sup>

하지만 심근허혈 때와 같은 과부하 상태에서  $K_{ATP}$  통로 활성 증가에 의한 칼륨 이온의 세포외 배출은 칼륨 이온의 세포 밖 축적을 유도하고 이로 인하여 나타나는 세포막의 탈분극화 현상 때문에 활동전위 기간과 불응기의 국소적인 차이를 일으켜서 결과적으로 허혈 심근에서 부정맥 발생의 원인이 되기도 한다.<sup>18)</sup> 즉,  $K_{ATP}$  통로 활성의 증가는 허혈 시 심혈관계 세포의 활동 전위 기간 단축에 의한 심근 수축력 감소, 혈관 확장 등의 긍정적인 면과 막전위의 탈분극에 의한 부정맥 발생의 부정적인 면을 동시에 가지고 있어서 임상적으로 관심 있는 이온 통로 중의 하나이다.<sup>19)</sup>

본 실험에서 유리 활성 산소가  $K_{ATP}$  통로를 활성화시키는 것은 확인하였으나 활동 전위 기간에 미치는 영향은 파악하지 못하여 이 통로의 활성이 심근 수축력 감소와 같은 허혈 심근의 보호 작용을 나타내는 지에 대한 직접적인 결과는 알 수 없었다.

심근보호는 아데노신(adenosine)과 산화질소(nitric oxide)의 생성이 증가함에 따라 심근의 protein kinase C가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데,<sup>22)23)</sup> 활성화된 protein kinase C와 산화질소는 세포막과 미토콘드리아  $K_{ATP}$  통로를 활성화시킨다.<sup>24)25)</sup> 세포막  $K_{ATP}$  통로의 활성은 활동전위 기간을 단축시키고 칼슘의 세포내 유입을 감소시켜 세포내의 칼슘 과부하를 억제한다. 심근 보호 작용은 주로 미토콘드리아  $K_{ATP}$  통로가 미토콘드리아의 칼슘과부하를 약화시켜 일어날 것으로 생각되나 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

Xanthine oxidase와 hypoxanthine에 의해 생성된 유리 활성 산소는 병태생리적으로 심근허혈과 재관류 시 발생하여 심근 손상을 일으키는 과정에서 생성되는 유리 활성 산소와 유사하기 때문에 그간 많은 연구에 이용

되었다.<sup>26)</sup> Xanthine oxidase와 hypoxanthine이 반응하면 superoxide anion( $O_2^{\cdot-}$ )이 생성되며, 이를 superoxide dismutase와 혼합시키면 역시 강력한 세포독성 작용이 있는 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )가 만들어 진다.<sup>27)</sup> 본 연구에서는 hydrogen peroxide 등 모든 유리 활성 산소를 포착하기 위하여 catalase를 사용하였다.

유리 활성 산소는 허혈 후 재관류동안 심근손상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 대사 활성, 이온 전달, 이온 평형, 수축능, 재관류 부정맥 등 다양한 구조적, 기능적 변화를 일으킨다. 미토콘드리아가 유리 활성 산소 발생장으로 밝혀져 있으며 미토콘드리아  $K_{ATP}$  통로의 활성이 유리 활성 산소 발생에 영향을 주어 심근보호 작용을 나타낸다고 알려져 있다. 이는 glibenclamide나 5-hydroxydecanoate(5-HD)와 같은  $K_{ATP}$  통로 억제제를 투여하면 심근 보호나 유리 활성 산소의 발생이 억제되는 것으로 알 수 있다.<sup>28)</sup> 그러나 본 연구에서는 그 대상이 세포막에 존재하는  $K_{ATP}$  통로여서, 유리 활성 산소의 발생 장소인 미토콘드리아  $K_{ATP}$  통로에 대한 연구가 앞으로 필요할 것으로 생각된다. 활성 산소 포착제의 유리 활성 산소에 의한  $K_{ATP}$  통로 활성 증가 억제는 두 가지 의미를 갖는 것으로 생각되는데 첫째, 포착제가 심근 허혈시 유리 활성 산소에 의한 심근 손상을 직접적으로 억제하는 것이고 둘째,  $K_{ATP}$  통로의 측면에서는 유리 활성 산소에 의해 증가된 통로의 활성이 포착제에 의해 억제되는 것이다.

앞으로 유리 활성 산소가  $K_{ATP}$  통로의 활성 및 활동전위 기간에 미치는 영향이 밝혀지면 그에 상응하는  $K_{ATP}$  통로의 활성제나 활성 산소 포착제의 적절한 사용이 허혈 심근의 보호 작용과 부정맥 발생의 예방에 기여할 것으로 생각된다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

심근허혈 시  $K_{ATP}$  통로는 허혈성 손상의 예방뿐 아니라 허혈-재관류 손상과 허혈 전조건(ischemic preconditioning)에도 관여하고 심근허혈 시 동반되는 심근 세포의 전기 생리학적 특성의 변화와 부정맥의 발생에도 기여하는 것으로 알려져 있다. 유리 활성 산소(Oxygen free radicals)는 심근허혈이나 재관류시 xanthine oxi-

dase 경로나 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidase 경로 등에 의해 대량으로 생성된다. 본 연구는  $K_{ATP}$  통로와 유리 활성 산소와의 관계를 밝히고자 시행되었다.

### 방 법 :

체중 25 g 내외의 ICR계의 수컷 mouse를 사용하여 심장을 적출한 후 Langendorff 장치에 매달고 Tyrode 용액으로 관류시킨 후 collagenase와 protease 효소로 소화시켜 단일 심실근세포로 분리하였다. 분리된 단일 심실근세포에서 patch clamp 방법 중 excised inside-out patch방법을 사용하여 단일 통로 전류를 기록하였다. 유리산소의 생성은 xanthine oxidase와 hypoxanthine을 혼합하는 방법을 사용하였다.

### 결 과 :

Excised inside-out patch를 시행한 직후 -60 mV의 유지전위상태에서 투여한 0.1 U/mL xanthine oxidase 및 0.5 mM hypoxanthine은  $K_{ATP}$ 통로의 활성에 영향을 주지 않았다. 200  $\mu$ M ATP로  $K_{ATP}$  통로의 활성을 약화시킨 후에 투여한 0.1 U/mL xanthine oxidase 및 0.5 mM hypoxanthine도 통로의 활성에 영향을 미치지 못하였다. 100  $\mu$ M ATP로  $K_{ATP}$  통로의 활성을 억제한 후 투여한 0.2 U/mL xanthine oxidase 및 1.0 mM hypoxanthine은  $K_{ATP}$  통로를 재활성화 시켰다. Superoxide dismutase(100 U/mL)와 catalase(122 U/mL)로 전처리한 후 투여한 0.2 U/mL xanthine oxidase 및 1.0 mM hypoxanthine은  $K_{ATP}$ 통로를 재활성화 시키지 못하였다.

### 결 론 :

생쥐 심실근세포에서 xanthine oxidase경로에 의해 생성된 유리산소는 excised inside-out patch에서  $K_{ATP}$  통로 활성을 증가시켰다.

**중심 단어 :** 유리산소 ; ATP 민감성 칼륨통로.

### ■ 감사문

본 연구는 2001년도 전남대학교병원 임상연구소 연구비(CUHRI-U-200157)에 의해 이루어졌음.

## REFERENCES

- 1) Janse MJ, Wit AL. *Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. Physiol Rev* 1989;69:1049-169.
- 2) Noma A. *ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle.*

- Nature* 1983;305:147-8.
- 3) Kakei M, Noma A, Shibasaki T. Properties of adenosine triphosphate-regulated potassium channels in guinea pig ventricular cells. *J Physiol* 1985;363:441-62.
  - 4) Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ. ATP-sensitive K channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res* 1991;68:280-7.
  - 5) Kim D, Clapham DE. Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science* 1989;244:1174-6.
  - 6) Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of  $K_{ATP}$  channels. *Science* 1998;282:1138-41.
  - 7) Shinbo A, Iijima T. Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive  $K^+$  current induced by  $K^+$  channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1997;120:1568-74.
  - 8) Obata T, Tamura M, Yamanaka Y. Evidence of hydroxyl free radical generation by calcium overload in rat myocardium. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:787-90.
  - 9) Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schmacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2571-83.
  - 10) Bkaily G, D'orleans-Juste P. Cytokine-induced free radicals and their roles in myocardial dysfunctions. *Cardiovasc Res* 1999;42:576-7.
  - 11) Ravingerova T, Slezak J, Tribulova N, Dzurba A, Uhrík B, Ziegelhoffer A. Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci* 1999;65:1927-30.
  - 12) Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-34.
  - 13) Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:S69-75.
  - 14) Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive  $K^+$  channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991;352:244-7.
  - 15) Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463-9.
  - 16) Cole WC, McPherson CD, Sontag D. ATP-regulated  $K^+$  channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 1991;69:571-81.
  - 17) Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992;70:223-33.
  - 18) Antzelevitch C, di Diego JM. Role of  $K^+$  channel activators in cardiac electrophysiology and arrhythmias. *Circulation* 1992;85:1627-9.
  - 19) McPherson GA. Current trends in the study of potassium channel openers. *Gen Pharmacol* 1993;24:275-81.
  - 20) Ashcroft FM. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 1988;11:97-118.
  - 21) Lynch JJ Jr, Sanguinetti MC, Kimura S, Bassett AL. Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. *FASEB J* 1992;6:2952-60.
  - 22) Banerjee S, Tang XL, Qiu Y, Takano H, Manchikalapudi S, Dawn B, Shirk G, Bolli R. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKC-dependent pathway. *Am J Physiol* 1999;277:H2488-94.
  - 23) Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, Banerjee S, Dawn B, Balafonova Z, Bolli R. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res* 1999;84:587-604.
  - 24) Downey JM, Cohen MV. Signal transduction in ischemic preconditioning. *Adv Exp Med Biol* 1997;430:39-55.
  - 25) Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000;101:439-45.
  - 26) Chambers DE, Parks 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* 1985;17:145-52.
  - 27) Brown JM, Terada LS, Grosso MA, Whitmann GJ, Velasco SE, Patt A, Harken AH, Repine JE. Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rabbit hearts. *J Clin Invest* 1988;81:1297-301.
  - 28) Jaburek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD. State-dependent inhibition of the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem* 1998;273:13578-82.