

μ -Opioid 작용제가 심실근 세포막의 ATP-민감성 칼륨통로의 활성화에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 약리학교실, 전남대학교 의과학연구소 및 BK21 전남대학교 의생명인력사업단

박령화 · 오미금 · 김재하*

Effects of μ -Opioid Agonist on ATP-sensitive Potassium Channel Activity in Isolated Ventricular Cardiomyocytes

Ling-Hua Piao, Meijin Wu and Jae-Ha Kim*

Department of Pharmacology, Chonnam National University Medical School,
Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, and The Brain Korea 21 Project,
Center for Biomedical Human Resources at Chonnam National University, Gwangju, Korea

It is well known that opioid agonists are released from the myocardium during hypoxia or ischemia, and that ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) exist in the cardiac cell membrane and function as a cardioprotector preventing the myocardium from ischemic damage. In the present study, therefore, to determine whether opioid agonists are involved in the regulation of ATP-sensitive potassium channel activities, effects of the μ -opioid agonist DAMGO were examined on K_{ATP} channel activities by using excised inside-out and cell-attached patch clamp techniques in enzymatically (collagenase and protease) isolated mouse ventricular cardiac myocytes. In the excised inside-out patches, DAMGO (1~300 μ mol/L) inhibited K_{ATP} channel activities in a dose-dependent manner. K_{ATP} channel activity, which had been attenuated by the addition of ATP (100 μ mol/L) to the internal solution, was not reactivated by DAMGO. The fashion of the single-channel inhibition by DAMGO was that both channel opening frequency and mean open-time were decreased, but the amplitudes of single channel currents and channel conductances were not altered. The half-maximal inhibition concentration (IC_{50}) for DAMGO was 18 μ mol/L. In the cell-attached patch configuration, however, DAMGO (1~300 μ mol/L) increased dinitrophenol (50 μ mol/L)-induced K_{ATP} channel activities. It was inferred that the μ -opioid agonist is involved in the regulation of ATP-sensitive potassium channel activity in cardiac myocardium, agonizing (through internal target) or antagonizing (through external target) the inhibitory action of ATP in a competitive manner, thereby attenuating or enhancing the channel openings.

Key Words: μ -Opioid agonist; K^{ATP} channels; Myocytes, Cardiac

서 론

포유동물의 심장에는 내인성 opioid 시스템(opioid 펩타이드와 opioid 수용체)이 존재하고 있는 바, 이는 정상 및 병적인 상태의 심장에서 이 opioid 시스템이 무엇인가 기능적으로 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 또한 수술이나 허혈과 같은 stress 상태에서 심장조직이나 심근세포에서 opioid 펩타이드들의 합성이 증가하면서 대량 유리된다는 사실이 알려져 있는데 이러한 현상은 허혈시에 유리가 증가된 카테콜라민의 작용을 상쇄시키고 경색(infarct)부위의 크기를 감소시키고자 하는 보상기전으로 알려져 있다.^{1,2} 또한 최근의 연구에 의하면 opioid들은 ischemic preconditioning (IPC)에 관여하고 있으며 이로 인해 저산소증이나 허혈로부터 심장을 보호하는 데 관여하는 물질로 알려져 있기도 하다.³

심혈관계 세포의 막 전위와 흥분성은 주로 칼륨통로(K^+ channel)의 활성화에 의해서 결정이 된다. 또한 심장에서 활동전위의 재분극은 칼륨통로가 열림으로써 일어나며, 칼륨통로의 열림과 닫힘에 의한 막전위의 과분극과 탈분극 현상은 심혈관계 평활근의 수축력을 조절하는 중요한 기전이 되고 있다. 심근세포막에는 다양한 특성의 칼륨통로가 있으며, 이 중 세포 내의 대사 상태에 연계되어 통로의 활성이 조절되는 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)가 있다.⁴ 이 통로는 정상적인 대사 상태의 세포에서는 닫혀있다가 세포 내 ATP의 농도가 어느 한계점 이하로 감소하거나 ATP/ADP 비가 낮아지면 열리게 된다. 이 통로가 활성화되면 칼륨이온(K^+)의 세포 외로의 배출(K^+ efflux)이 증가하게 되어 활동전위의 재분극이 빨라지고 탈분극 후 재분극 시까지의 활동전위 기간(plateau phase)이 단축되어 칼슘의 세포 내로의 유입(Ca^{2+} influx) 시간이 짧아지게 된다. 따라서 심근의 수축은 억제되며 허혈 심근에서의 에너지 소비는 감소하고 칼슘의 과부하가 차단됨으로써 허혈 심근조직의 생존이 연장된다.⁵ 결국 K_{ATP} 통로는 이와 같은 작동 방식에 의해서 심근 허혈과 같은 대사 stress에 대하여 내인성으로 작동되는 '보호 기전'의 하나로 생각되고 있다.⁶ 따라서 많은 연구자들이 이 이온통로의 활성도를 직접 또는 간접적으로 조절하는 물질에 관심을 갖게 되었고 이 이온 통로의 기능과 활성 조절기전을 알아내고자 노력해 왔다.

심장 또는 혈관 평활근의 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)의 활성조절에 관여한다고 알려져있는 물질들은 매우 다양하다. 여기에는 약물 뿐만 아니라 내인성으로 유리되어 작용하는 물질도 상당수 있다. 허혈시 대사가 증가하여 그 대사

산물이 유리되거나 세포 내에 축적되는 내인성 opioid들도 K_{ATP} 통로 활성 조절에 관여할 가능성이 매우 높다. 내인성 opioid들 중에서 잘 알려진 enkephalin이나 β -endorphin은 허혈이나 저산소증상태에서 유리되는 것으로 알려져 있으며¹ 심장의 부정맥 발현을 억제시킨다는 보고⁷와 이와는 반대로 부정맥을 유발한다는 연구보고도 있다.⁸ 또한 근래의 연구에 의하면 opioid 작용제 중에서 가장 널리 사용되고 있는 morphine은 심장에서 활동전위 기간을 증가시키고 최대상속속도(V_{max})를 감소시킨다는 사실이 알려져 있으며,⁹ 이것은 칼륨통로 또는 칼슘통로에 작용하여 나타난 결과일 수 있다. 최근에 Xiao 등¹⁰은 morphine에 의해 칼슘전류가 증가함을 보고하였으며 Cao 등¹¹은 opioid 펩타이드가 δ - 및 κ -수용체를 통해 심근세포 보호작용에 관여하는데 이것은 K_{ATP} 통로를 통하여 매개된다고 보고하였다. 이러한 연구 결과는 opioid 작용제가 허혈시 그 활성이 증가하는 K_{ATP} 통로활성조절에 관여할 가능성이 있음을 암시하고 있다.

따라서 본 연구는 심근 허혈시에 유리되어 축적되는 opioid 수용체 작용제들과 심근세포막에 존재하여 허혈 심근 보호작용에 관여하는 ATP-민감성 칼륨통로의 활성조절과의 상호관계가 있는지의 여부와 그 기전을 알아봄으로써, 내인성 opioid 물질들이 허혈성 심장질환의 병태생리에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 단일 심실근세포의 분리

Patch clamp 실험에 사용할 단일 심실근세포의 분리는 체중 25 g 내외의 ICR계 생쥐를 암수 구분없이 사용하였다. 생쥐를 경추탈구법으로 실신시킨 후 흉강을 열고 심장을 적출한다. 적출한 심장을 4°C 100% 산소로 포화된 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 적정) 내에서 미세가위를 이용하여 해부현미경($\times 20$) 시야에서 주변연결조직과 지방조직을 제거하고 대동맥에 catheter를 삽입한 후 절찰하였다.

Langendorff 장치에 분리된 심장을 매달고 37°C의 Tyrode 용액을 관상동맥을 통해 1.5 mL/min의 속도로 5분간 관류시켰다. 이어서 심장박동이 멈출 때까지 Ca^{2+} -free Tyrode 용액으로 관류시키고 심장이 완전히 이완되면 0.6 mg/mL의

collagenase (Worthington Biochemical Co. CLS₂)와 0.15 mg/mL의 protease (Sigma type XIV)를 함유한 Ca²⁺-free Tyrode 용액으로 약 25분간 관류시킨 다음, 마지막으로 high K⁺-low Cl⁻ 용액(조성: 20 mM taurine, 70 mM glutamic acid, 25 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, KOH로 pH를 7.35로 적정)을 5분간 관류시켜 심장 내에 남아있는 효소를 제거시켰다.

소화된 심장에서부터 심실 부분을 떼어내어 high K⁺-low Cl⁻ 용액에 넣고 여러 절편으로 자른 다음 pipette으로 가볍게 기계적 자극을 주어 단일 심실근세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 high K⁺-low Cl⁻ 용액에 보관한 후 도립현미경(inverted microscope, American Optical Co.)상에서 막대기 모양의 무늬가 분명하며 윤곽이 뚜렷하고 움직임이 없는 세포들만 골라 실험에 사용하였다.

2. 미세전극의 제작

Patch clamp용 미세전극은 내경 1.5 mm의 borosilicate 유리관(Clark Electromedical Instruments Co., PG150T-7.5)을 미세전극제작기(Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Co., P-97)를 이용하여 저항이 4~5 MΩ 정도되게 뽑고 광학현미경(stereozoom microscope, Nikon, SMZ-2B) 하에서 미세전극 말단 근처 부위까지 Sylgard (Corning Co.)를 도포한 후 가열된 니크롬선 하에서 건조시켰다. 이렇게 만들어진 미세전극의 말단을 다시 광학현미경(Microforge, Narishige, MF-83) 하에서 관찰(500배)하면서 전극 말단부에 열을 가하여 다듬은(polishing) 후 저항이 2~7 MΩ 정도 되는 전극을 실험에 사용하였다.

3. 단일통로전류측정 및 분석

단일통로전류는 gigaohm-seal patch clamp 방법 중 excised inside-out과 cell- attached membrane patch 방법(Fig. 1)¹²을 사용하여 기록하였다. Patch clamp 증폭기(Axopatch 200A, Axon Instruments Inc.)를 통하여(이때 cut-off frequency는 2 kHz) 측정된 전기적인 신호는 디지털 신호 기록기(digital data recorder, Instrutech Co., VR-10B)를 거쳐 비디오(SAMSUNG, SV-14D) 테이프에 기록하였다. 단일통로전류의 분석은 비디오테이프에 기록된 것을 재생하여 A/D converter인 Digidata 1200 interface (Axon Ins-

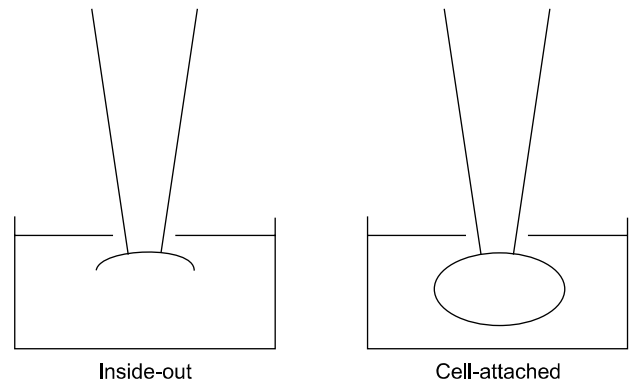


Fig. 1. Patch clamp configurations used in the present study. Excised inside-out (left) and cell-attached (right) configurations respectively.

truments Inc.)에 연결하여 프로그램 pClamp (Axon Instruments Inc.)를 이용하여 컴퓨터에 저장하고 분석하였다.

단일통로의 열리고 닫히는 시간의 측정은 half-maximum single-unit amplitude threshold 방법을 이용하였다. Open probability (Po)는 Spruce 등¹³의 방법에 의한 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$Po = \left(\sum_{j=1}^n t_j \right) / (Td \cdot n)$$

이 식에서 t_j는 j=1, 2,...,n개의 통로가 열릴 때 각각의 전류단계에서의 통로가 열려있는 시간, Td는 단일통로전류를 기록한 시간, n은 control 상태에서 최대로 활성화되는 통로의 수를 가리킨다. Po는 30초 이상의 연속된 단일통로 기록들로부터 계산하였고, relative open probability는 약물 투여 전의 Po와 투여 후의 Po의 차이를 약물투여 전의 Po에 대한 백분율로 표시하였다.

4. 실험에 사용된 용액과 약물

단일 통로전류 측정을 위한 용액은 internal, pipette 및 bath solution으로서 각각 K-5 용액을 사용하였다(조성: 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA 및 10 mM HEPES, pH는 HCl로 7.2로 적정).

Opioid 수용체 작용제 DAMGO, K_{ATP} 통로 차단제 glibenclamide, 대사억제제 2,4-dinitrophenol, Adenosine triphosphate 등을 사용하였으며 모두 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다.

결 과

1. Excised inside-out patch 실험에서 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로) 전류의 확인

단일 심실근 세포에서 ATP-free K-5 용액 관류 하에서 excised inside-out patch를 만들고 -60 mV의 유지 전위 (holding potential)를 가하면 내향성 전류의 통로 활성이 나타났다. 이어서 세포내측 관류액에 ATP 1 mmol/L을 첨가하면 통로 활성이 점차 약화되어 1분 경과 시에는 활성이 거의 나타나지 않았다. 세포내측 관류액을 ATP가 없는 실험용액으로 교체하면 통로 활성이 다시 나타나기 시작하여 3분 경과 시에는 excised inside-out patch 시행 직후의 통로 활성과 비슷한 수준을 유지하였고, 이때 세포내측 관류액을 K_{ATP} 통로 억제제인 glibenclamide $50 \mu\text{mol/L}$ 를 첨가한 실험용액으로 교체하면 통로 활성이 점차 약화되어 교체 후 1분 경부터는 통로 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2).

전류-전압 상관관계 곡선은 내향정류성(inward rectification)을 보였으며 slope conductance는 62 ± 1.3 pS(5예)

였다. -60 mV 유지전위시의 단일 통로 전류 평균치는 -3.7 ± 0.26 pA (5예)였고 한 개의 통로가 열려있는 dwell time과 통로 활성의 정도는 반비례 관계였다. 이상의 통로 특성으로 보아 본 연구의 inside-out patch에서의 단일 통로 활성은 ATP-민감성(K_{ATP}) 통로 활성임이 확인되었다.

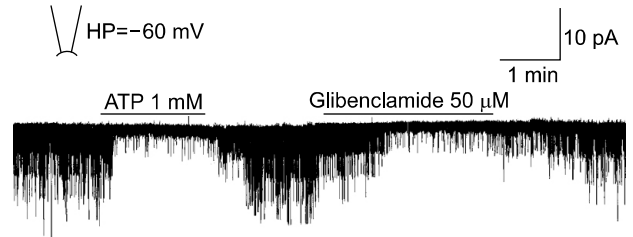


Fig. 2. Representative recording of the typical K_{ATP} channel activity in the excised inside-out patch at -60 mV holding potential. The channel activity was appeared immediately after making inside-out patch, and 1 mM ATP almost completely inhibited the channel activity. The channel activity reappeared when the ATP was washed out from the bath solution, and then $50 \mu\text{M}$ glibenclamide inhibited the channel activity.

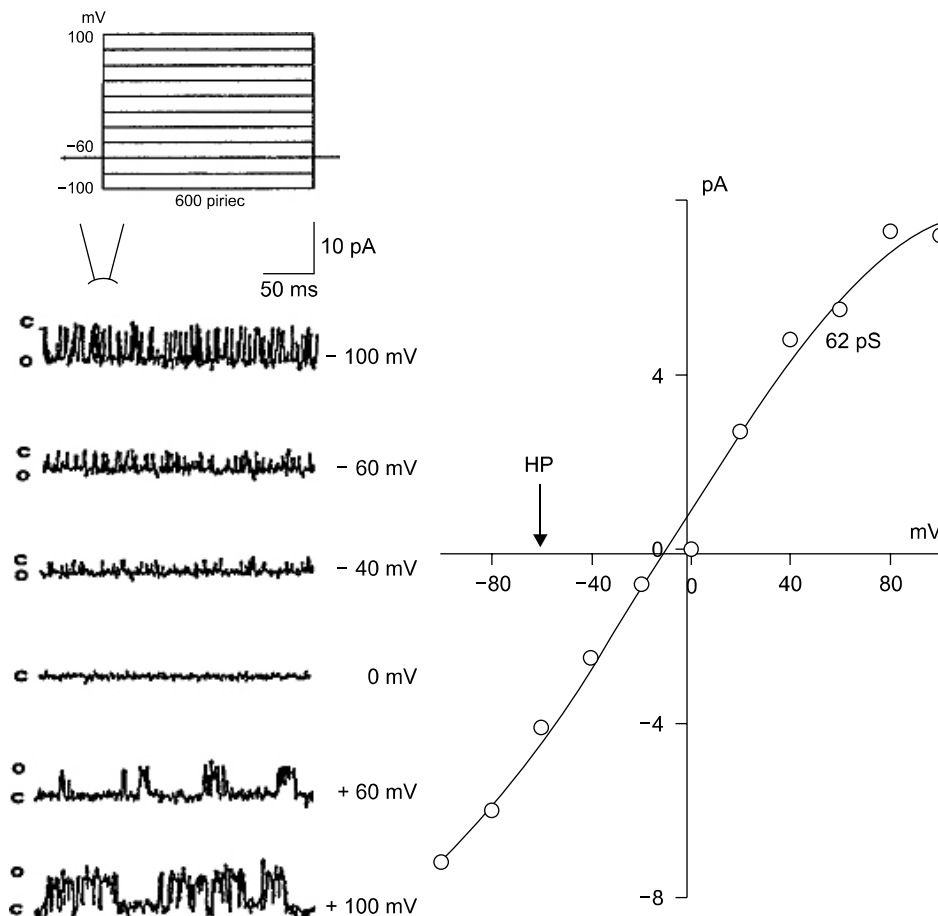


Fig. 3. I-V properties of the ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) currents. Recordings were obtained in excised inside-out patch membrane of isolated rat ventricular myocytes at different clamp potentials ranging from -100 to $+100$ mV (right panel). The current-voltage relationship (left panel) was plotted with the single channel currents of the right panel.

본 연구의 inside-out patch 실험에서는 -60 mV 유지전위 시에 나타나는 내향 전류를 실험대상으로 하였다(Fig. 3).

2. Excised inside-out patch의 세포내측 관류액에 투여한 DAMGO가 K_{ATP} 통로활성에 미치는 영향

Excised inside-out patch의 세포내측 관류액에 투여한 DAMGO ($1 \sim 300$ μ mol/L)는 통로활성을 감소시켰고, 그 감소의 정도는 용량에 비례하여 컸으며 half-maximal inhibitory concentration (IC_{50})은 18.5 ± 3.7 μ mol/L이었다(Fig. 4, 5).

DAMGO의 통로활성 억제 양상은 통로열림의 빈도(frequency)와 평균 열림기간(mean open-burst time)은 현저히 감소시켰으나 단일 통로 전류의 크기에는 영향을 미치지 않았다. 또한 excised inside-out patch에서 DAMGO를 투여하지 않은 대조군에서의 전류-전압 관계곡선과 세포내측 관류액에 DAMGO 100 μ mol/L 투여한 후 5분 경과 시의

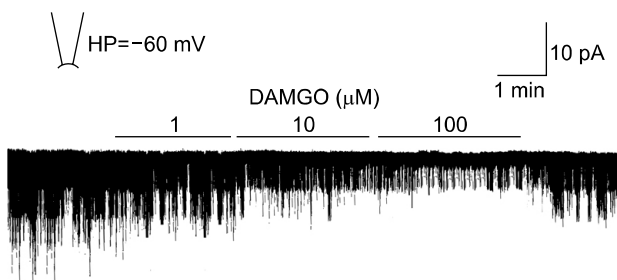


Fig. 4. Effect of linoleic acid on the K_{ATP} channel activities. Recordings show that DAMGO ($1 \sim 100$ μ mol/L) inhibited the channel activities at -60 mV holding potential in the excised inside-out patch.

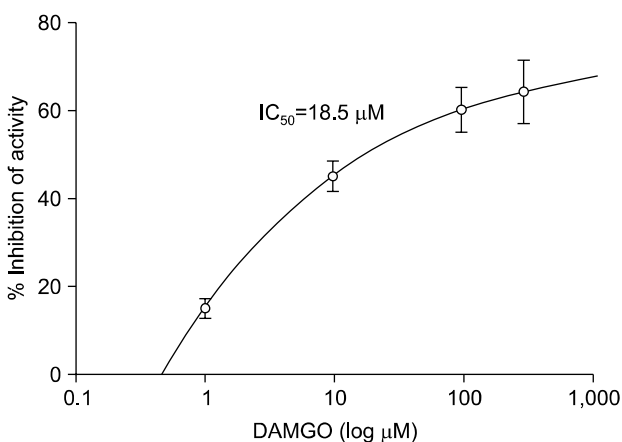


Fig. 5. Dose-response curve of K_{ATP} channel inhibition by the DAMGO in the excised inside-out patch. Each points denote the mean of 3~4 experiments and the vertical bar is SEM.

전류-전압관계 곡선으로부터 얻은 conductance는 각각 62 ± 1.4 및 62 ± 1.6 pS로서(각 4예) 두 군간에 유의한 차이가 없었다. 즉 본 연구의 DAMGO는 K_{ATP} 통로의 전도도(conductance)에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 6).

3. Excised inside-out patch에서 DAMGO가 K_{ATP} 통로활성을 증가시킬 수 있는 지의 여부 확인

ATP-free K-5 용액 관류 하에서 excised inside-out patch를 시행한 직후에는 세포 내 $[ATP]_i$ 가 0 (zero)인 상태이므로 K_{ATP} 통로활성이 최대로 나타난다. 따라서 통로활성을 증가시키는 약물의 효과는 은폐되어 나타나지 않을 것이다. DAMGO가 K_{ATP} 통로활성을 증가시킬 수 있는 가능성을 알아보하고자 excised inside-out patch의 세포내측 관류액에 ATP 100 μ mol/L을 투여하여 통로활성을 약화시키고 여기에 DAMGO 50 μ mol/L을 첨가하여 통로활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그러나 DAMGO는 ATP 존재 하의 약화된 통로활성을 증가시키지 못하였다(Fig. 7).

4. Cell-attached patch 실험에서 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로) 전류의 확인

단일 심실근 세포에서 ATP-free K-5 용액 관류 하에서 cell-attached patch를 만들고 -60 mV의 유지 전위(holding potential)를 가하면 미미한 정도의 내향성 전류의 통로 활성이 나타났다. 이어서 관류액에 대사억제제인

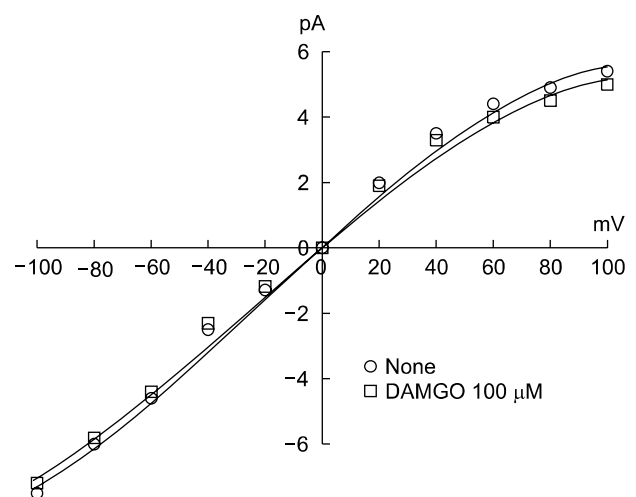


Fig. 6. Influence of DAMGO (100 μ M) on the current-voltage curves of the ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}). The current-voltage relationship was plotted with the single channel currents in the excised inside-out patch at different clamp potentials, and the channel conductance was not changed by the DAMGO.

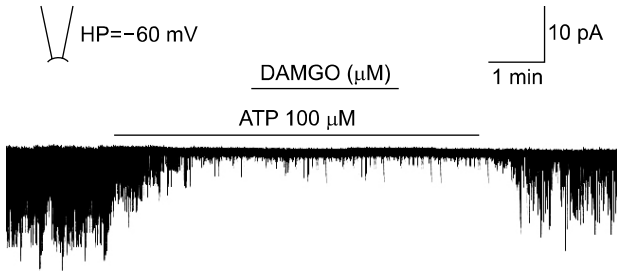


Fig. 7. Effect of DAMGO (100 μ M) on the attenuated K_{ATP} channel activity in the presence of internal 100 μ M ATP in the inside-out patch at -60 mV holding potential. DAMGO did not increase the channel activity.

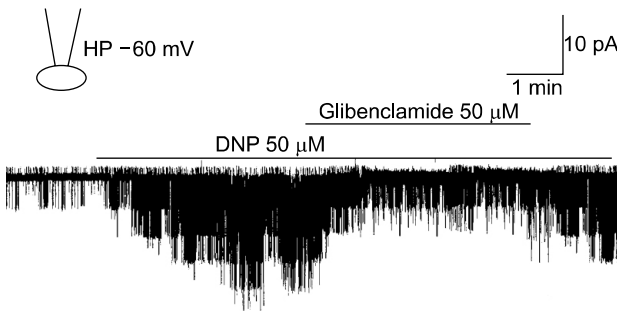


Fig. 8. A trace showing typical K_{ATP} channel activities in a cell-attached patch of an isolated mouse cardiac myocyte at -60 mV holding potential (HP). Dinitrophenol (DNP) induced channel activities and these activities were inhibited by glibenclamide.

dinitrophenol (DNP) 50 μ mol/L을 첨가하면 통로 활성이 점차 증가되어 3분 경과 시에는 활성이 거의 최대로 나타났다. 이때 관류액을 K_{ATP} 통로 억제제인 glibenclamide 50 μ mol/L을 첨가한 실험용액으로 교체하면 통로활성이 점차 약화되어 1분 경부터는 통로활성이 최대로 억제되었고, 다시 ATP-free K-5 용액으로 관류하면 서서히 활성이 증가하였다(Fig. 8). 유지전위 -60 mV 시의 단일 통로 전류 평균치는 inside-out patch 실험에서의 경우와 비슷하게 -3.8 ± 0.19 pA (5예)였고 한 개의 통로가 열려있는 dwell time과 통로활성의 정도는 반비례 관계였다. 이상의 통로 특성으로 보아 본 연구의 cell-attached patch에서의 단일 통로활성은 ATP-민감성(K_{ATP}) 통로 활성임이 확인되었다. 본 연구의 cell-attached patch 실험에서는 -60 mV 유지전위 하에서 DNP 투여 시에 나타나는 내향 전류를 실험 대상으로 하였다(Fig. 8).

5. Cell-attached patch에서 bath 내에 투여한 DAMGO가 DNP-induced K_{ATP} 통로활성에 미치는 영향

Cell-attached patch에서 DNP 50 μ mol/L을 bath액에

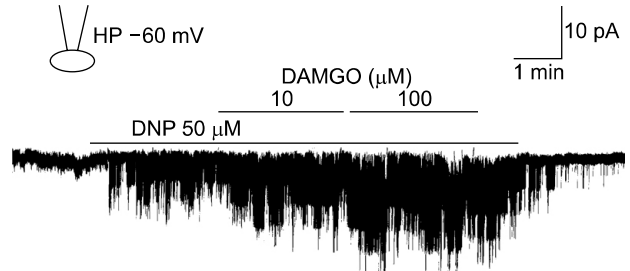


Fig. 9. Effects of DAMGO (10 and 100 μ mol/L) on the dinitrophenol (DNP)-induced K_{ATP} channel activities in the cell-attached patch at -60 mV holding potential (HP). DAMGO increased the DNP-induced channel activities in a dose-dependent manner.

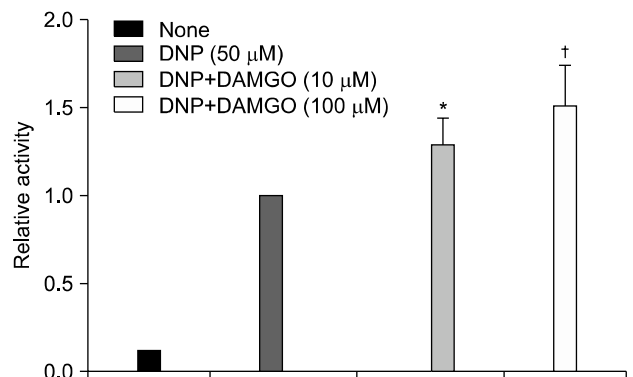


Fig. 10. Effects of DAMGO on the dinitrophenol (DNP)-induced channel activities in the cell-attached patches. Relative activity at 1.0 represents the channel activities for 30 sec of DNP superfusion. Each columns and vertical bars represent mean \pm SEM of 4 to 5 experiments. * and \dagger indicate significant differences at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (\dagger) compared with the DNP-induced control activities, respectively.

투여하여 K_{ATP} 통로활성을 유도하고 여기에 DAMGO 10 및 100 μ mol/L을 첨가하여 통로활성에 미치는 영향을 조사하였다. DNP 50 μ mol/L 투여 후 K_{ATP} 통로활성은 점차 증가하기 시작하였고 투여 후 3~5분이 경과할 즈음에는 거의 최대 활성을 나타내었다. 이런 상태에서 bath액에 첨가한 DAMGO는 DNP 50 μ M에 의해서 유도된 K_{ATP} 통로활성을 용량에 비례하여 증가시켰다(Fig. 9, 10).

고 찰

본 연구는 μ opioid 작용제인 DAMGO가 효소분리법으로 분리한 생쥐의 단일 심실근세포에서 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)의 활성조절에 관여하고 있음을 보여주고 있다.

K_{ATP} 통로는, 심근 허혈 현상과 밀접한 관련이 있는 이온

통로로서, 세포 내 ATP의 농도에 따라 그 활성이 조절되는 이온통로로 잘 알려져 있으며 주로 혈관평활근의 막전위와 긴장도 조절¹⁴에 관여하거나 췌장의 β 세포에서의 인슐린 유리¹⁵에 중요한 역할을 하는 이온통로로 알려져 있다. 또한 심근의 허혈이 시작된 후 수분 내에 일어나는 세포에서의 K^+ 손실¹⁶ 및 세포 외 K^+ 축적현상^{17,18}은 심근이 허혈 또는 저산소 상태에 놓이게 되어 세포 내 ATP가 감소하면 이 이온통로가 열리면서 일어나는 K^+ 유출 때문이다. 즉 K_{ATP} 통로는 심근에서 일어나는 허혈 현상의 병태생리에 관여하고 있다는 것이다. 따라서 이 통로의 활성을 조절하는 물질들에 대한 연구가 관심을 불러 일으키고 있다.

Opioid 펩타이드들은 심장, 교감신경, 부신 등과 같은 말초 심혈계 기관에서 발견되고 있다. 지금까지 세가지 종류의 내인성 opioid 펩타이드들(enkephalins, endorphins, dynorphins)이 클로닝(cloning) 되었으며 이들은 각각 pro-enkephalin, prodynorphin, proopiomelanocortin의 전구 물질에서 유리되는 것으로 알려져 있다. 이들 세가지 전구물질들의 유전자는 심방, 심실, 심근세포에서도 발현되고 있어서 심장 내에서도 이들 opioid 펩타이드들이 합성, 유리되어 작용할 수 있음을 추정할 수 있다. Opioid 수용체에는 세가지 즉, δ , κ , μ -수용체가 존재하고 있으며, 일반적으로 μ -와 δ -수용체는 enkephalins 및 endorphins과 결합하고 κ -수용체는 dynorphins와 결합하는 것으로 알려져 있다.¹⁹

본 연구의 μ opioid 작용제인 DAMGO가 효소분리법으로 분리한 생쥐의 단일 심실근세포에서 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP} 통로)의 활성조절에 관여하는 방식은, excised inside-out patch 실험에서는 용량에 비례한 통로활성 억제를, 그리고 cell-attached patch 실험에서는 용량에 비례한 통로활성 증가를 일으키는 것이었다. 이처럼 실험 형태에 따라 효과가 다르다는 사실은 DAMGO의 세포 내외의 작용표적이 다르다는 것을 시사하고 있다. excised inside-out patch 실험에서는 통로 부근 또는 통로 자체의 표적물질에 작용하여 통로활성 억제, 그리고 cell-attached patch 실험에서는 세포막 표면의 수용체에 작용하여 통로활성 증가를 일으켰다고 생각할 수 있다. 이와 같은 가정은 세포 내 신호전달 과정 또는 세포막 수용체에 작용하는 ligand 실험 등을 통해 증명해야 할 것으로 보인다. 그러나 일부 연구자들의 보고에 따르면 흰쥐(rat)의 심근세포막에는 δ 와 κ -수용체는 존재하나 μ -opioid 수용체는 존재하지 않는다^{20,21}고 하였던 바, 비록 대상 실험동물(mouse)이 다르기는 하나, 본 연구 결과의 해석에 좀 더 정교한 실험적인 연구가 필요

하리라 생각된다.

또한 내인성 opioid 펩타이드들은 스트레스를 포함한 다양한 자극에 의해 심장에서 그 농도가 증가하고 궁극적으로 말초순환으로 대량 유리된다는 사실이 잘 알려져 있다.²² Weil 등²³은 쥐의 좌심실을 내분비기관에 비유하면서 enkephalins이 좌심실에서 유리되어 체내로 공급된다고 하였다. 한편, 심장에서 opioid 펩타이드들은 연령²⁴이나 질병²에 따라 그 농도가 증가한다고 한다. 특히, 심근허혈 시에는 opioid 펩타이드들의 합성과 유리 증가가 일어난다고 하며 실제로, 인간에게서 β -endorphin의 농도가 급성 심근허혈증이 있는 환자나 혈관형성술(angioplasty)을 시행 중인 환자에게서 더 높다는 보고도 있다.^{1,2} 허혈 동안 경색된 쥐의 심실조직에서 enkephalins의 농도가 올라가는데 이것은 경색 부위의 크기를 줄이려는 현상으로 추정되고 있다.² 그리고 opioid 수용체의 자극을 통해 심장의 교감신경을 억제하는 것도 심장을 보호할 수 있는 또 다른 기전이 될 수 있다고 한다.²⁵ 이러한 점들은 opioid가 저산소증과 관련된 병적상태에서 중요한 역할을 하고 있음을 암시하고 있으며 심근경색과 같은 심장질환 시에 일어날 수 있는 세포손상을 억제하는 중요한 인자가 되고 있으나 아직까지 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 본 연구의 cell-attached patch 실험에서 DAMGO가 통로활성 증가를 일으킨 것은 허혈성 심근에는 긍정적으로 작용할 것으로 생각되나, excised inside-out patch 실험에서 통로활성 억제를 일으킨 점은 오히려 부정적으로 작용할 것으로 보인다.

Ischemic preconditioning (IPC)은 짧은 기간 동안 심장을 허혈상태에 노출시킴으로써 이후에 나타나는 장시간의 허혈상태로부터 심장을 보호하는 기전으로서 이 현상은 심근허혈과 관련된 임상적용 가능성 때문에 광범위한 연구가 진행되고 있다. 지금까지 이 IPC에는 K_{ATP} 통로를 포함한 수많은 중요한 mediator 또는 modulator가 관련되어 있으며, Schultz 등²⁶에 의해 opioid의 IPC 관련성이 최초로 보고된 이래 여러 연구자들에 의해 opioid와 심장보호 효과의 상호연관성에 대해서 최근 많은 연구가 이루어지고 있다. Schultz 등²⁶의 실험에 따르면, 허혈 전에 morphine을 투여하면 경색부위의 크기를 감소시키고 opioid 수용체 길항제인 naloxone은 그 효과를 차단했다고 한다. 이 후 여러 실험에 의해 opioid-induced cardioprotection에서 δ -opioid 수용체가 심장을 보호하는 데 중요한 매개체 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.²⁷ 한편, opioid 수용체는 G-단백을 통하여 adenylate cyclase activity를 약화시키고 cAMP 생산을 감

소시킨다는 사실도 알려져 있다. Opioid 수용체의 활성화에 의한 preconditioning은 protein kinase C가 관여하며 K_{ATP} 통로의 활성화를 통해 매개된다고 여러 연구자에 의해서 보고되고 있다.¹¹

이 밖에도 opioid들과 K_{ATP} 통로와의 관련성을 암시하는 여러 보고가 있다. Wild 등²⁸은 opioid 수용체는 G_i 단백을 통해 칼륨통로와 연결되어 있으며 neuronal K_{ATP} 통로는 μ 와 δ opioid 수용체 자극에 의해서 유도된 진통작용을 매개함을 보여주었다. 또한 담낭공복(emptying)과 저산소증에 의한 연막(pial) 동맥확장에도 opioid들과 K_{ATP} 통로가 관련되어 있음이 알려지고 있다. Patil과 Thakker²⁹는 담낭의 운동성(motility)에 대한 morphine의 억제효과를 glibenclamide가 차단하였다고 보고하였으며, Amstead³⁰의 보고에 의하면 nociceptin/orphanin FQ는 K_{ATP} 통로와 K_{Ca} 통로의 활성화를 통해 연막동맥의 확장을 일으킨다고 하였다. 또한 multicellular 표본에서 morphine은 탈분극의 최대속도를 감소시키고 활동전위기간을 증가시켰다.⁹ Alarcon 등⁹은 기니픽의 유두근에서 활동전위기간을 늘리는 morphine의 효과가 glibenclamide에 의해서는 영향을 받지 않았지만 diazoxide에 의해서는 억제되었다고 보고하였다.

이처럼 심장의 opioid 시스템과 K_{ATP} 통로와의 관련성을 간접적으로 시사하는 다양한 연구 보고들이 있으나, 본 연구는 opioid 작용제가 심근세포막의 ATP-민감성 칼륨통로(K_{ATP})의 활성 조절에 미치는 영향을 분리된 단일 심실근 세포에서 patch clamp의 방법을 이용하여 직접적으로 측정해 보았다는 데에 의미가 있으며, 향후 세포막 수용체와 관련된 작용, 2차전령계를 포함한 세포 내 신호전달 과정에 미치는 영향, 그리고 통로 활성을 직접적으로 조절하는 기전 등을 밝혀내어 opioid 작용제가 심근 허혈시 어떤 역할을 할 것 인지를 규명해야 할 것이다.

알 림

이 논문은 전남대학교병원 임상의학연구소 학술연구비(CR107017-1)에 의하여 연구되었음.

References

1. Oldroyd KG, Harvey K, Gray CE, Beastall GH, Cobbe SM. Beta endorphin release in patients after spontaneous and provoked acute myocardial ischaemia. *Br Heart J* 1992;67:230-5.
2. Paradis P, Dumont M, Belichard P, Rouleau JL, Lemaire S, Brakier-Gingras L. Increased preproenkephalin A gene expression in the rat heart after induction of a myocardial infarction. *Biochem Cell Biol* 1992;70:593-8.
3. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994;266: H1145-52.
4. Weiss J, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K^+ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol* 1989;94:911-35.
5. Noma A, Takano M. The ATP-sensitive K^+ channel. *JPN J Physiol* 1991;41:177-87.
6. Escande D, Caverio I. Potassium channel openers in the heart. In: Escande D, Standen N, eds. K^+ Channels in cardiovascular medicine. Paris: Springer-Verlag 1993;225-44.
7. Maslov LN, Lishmanov YB. Change in opioid peptide level in the heart and blood plasma during acute myocardial ischemia complicated by ventricular fibrillation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:812-6.
8. Wong TM, Lee AY, Tai KK. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart. an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 1990;22: 1167-75.
9. Alarcón S, Hernandez J, Laorden ML. Diazoxide blocks the morphine induced lengthening of action potential duration on guinea-pig papillary muscle. *Gen Pharmacol* 1995;26:589-92.
10. Xiao GS, Zhou JJ, Cheung YF, Li GR, Wong TM. Effects of U50,488H on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier K^+ currents in young human atrial myocytes. *Euro J Pharmacol* 2003;473: 97-103.
11. Cao Z, Liu L, Van Winkle DM. Activation of δ - and kappa-opioid receptors by opioid peptides protects cardiomyocytes via K_{ATP} channels. *Am J Physiol* 2003;285:H1032-9.
12. Piao LH, Kim JH. Role of plasmalogen-derived lysolipids on the pathophysiology of myocardial ischemia. *Chonnam Medical J* 2007;43: 168-76.
13. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985;316:736-8.
14. Xu X, Lee KS. Characterization of the ATP-inhibited K^+ current in canine coronary smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1994;427:110-20.
15. Ashcroft FM. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 1988;11:97-118.
16. Weiss J, Shine KI. Effects of heart rate on extracellular $[K^+]$ accumulation during myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1986;250: H982-91.
17. Hill JL, Gettes LS. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine. *Circulation* 1980;61:768-78.
18. Hirche H, Franz C, Bös L, Bissig R, Lang R, Schramm M. Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion In pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12:579-93.
19. Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* 1998;51:127-40.

1. Oldroyd KG, Harvey K, Gray CE, Beastall GH, Cobbe SM. Beta endorphin release in patients after spontaneous and provoked acute

20. Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC. kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 1992;70:66-81.
 21. Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:877-81.
 22. Holaday JW. Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:541-94.
 23. Weil J, Eschenhagen T, Fleige G, Mittmann C, Orthey E, Schloz H. Localization of preproenkephalin mRNA in rat heart: selective gene expression in left ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1998;275: H378-84.
 24. Boluyt MO, Younes A, Caffrey JL, O'Neill L, Barron BA, Crow MT, et al. Age-associated increase in rat cardiac opioid production. *Am J Physiol* 1993;265:H212-8.
 25. Mantelli L, Corti V, Ledda F. On the presence of opioid receptors in guinea-pig ventricular tissue. *Gen Pharmacol* 1987;18:309-13.
 26. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995;268:H2157-61.
 27. Takasaki Y, Wolff RA, Chien GL, Van Winkle DM. Met5-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via delta-opioid receptors. *Am J Physiol* 1999;277:H2442-50.
 28. Wild KD, Vanderah T, Mosberg HI, Porreca F. Opioid delta receptor subtypes are associated with different potassium channels. *Eur J Pharmacol* 1991;193:135-6.
 29. Patil BM, Thakker PR. Glibenclamide antagonizes the inhibitory effect of morphine on gall bladder emptying. *J Pharm Pharmacol* 1996;48: 320-2.
 30. Amstead WM. Nociceptin/orphanin FQ dilates pial arteris by K(ATP) and K(ca) channel activation. *Brain Res* 1999;835:315-23.
-