

Guinea Pig Heart의 관상동맥 순환기능과 Calcium Release에 있어서 Caffeine이 미치는 영향*

김은지 · 김은미 · 강영희

한림대학교 자연과학대학 식품영양학과

Effect of Caffeine on Coronary Circulation and Calcium Release in Isolated Guinea Pig Hearts

Kim Eun Ji · Kim Eun Mee · Kang Young Hee

Department of Food and Nutrition, Hallym University

ABSTRACT

The present study examined effects of caffeine on coronary circulation, myocardial oxygen metabolism and calcium release in isolated perfused guinea pig hearts. Intracoronary caffeine(10^{-5} ~ 10^{-3} M) was employed for 10 minutes to measure coronary perfuse flow(CF) and coronary vascular resistance(CVR) at a constant coronary perfusion pressure of 80 cmH₂O. Perfusion gases and pH were measured routinely in inflow and outflow perfusate samples, and global myocardial oxygen consumption(MVO₂) and percent oxygen extraction(% EO₂) were calculated. In addition, calcium contents in both perfusate samples were measured to calculate calcium release in coronary venous effluent. Caffeine significantly decreased CF and increased CVR during 10 minutes of caffeine perfusion regardless of dose of caffeine perfused, exhibiting time-response. While % EO₂ was significantly enhanced with caffeine, MVO₂ was markedly reduced. The coronary venous perfusate pH decreased during the perfusion with caffeine. These changes were consistent with caffeine-induced metabolic acidosis. Calcium release appeared to be dose-dependent, and high dose of caffeine greatly increased venous calcium release even 2 minutes after perfusion with caffeine. These findings indicate that caffeine produced coronary vasoconstriction with increased calcium release in isolated perfused guinea pig hearts. Additionally, this vasoconstrictor response might be due, in part, to the direct actions of caffeine.

KEY WORDS : Caffeine · Coronary circulation · Calcium · Myocardial oxygen metabolism.

채택일자 : 1992년 9월 22일

*본 연구의 결과 일부는 1991년 11월 추계 한국영양학회에서 발표되었음.

서 론

커피, 홍차, 콜라 등의 식품 뿐만 아니라 각종 의약품 등에 caffeine이 다량 들어있다는 사실은 이미 오래 전부터 알려져왔다. caffeine은 일반적으로 종추신경을 자극하고, 필수 영양소의 흡수를 저해하는 동시에 이뇨작용을 촉진시키는 효과를 가지고 있으며, 또한 심박동수와 혈압을 상승시키고, 불면증을 유발시키는 요인으로 알려져 있다¹⁾. 이와같이 caffeine이 신체 각 조직에 다양한 효과를 초래한다고 알려지므로써, 커피를 비롯한 caffeine이 들어 있는 여러 가지 식품 또는 의약품의 과잉 섭취에 따른 건강상의 문제가 현재 가시화되고 있다. 특히, 최근 수 년 동안 고혈압, 협심증 및 심근경색 등의 순환기 질환에 끼치는 caffeine의 작용에 대해서 많은 연구가 진행되어지고 있다^{2~4)}. 그러나, caffeine의 작용에 대한 학자들 간의 서로 다른 연구결과로 인하여 caffeine의 작용은 여전히 논쟁의 대상이 되고 있다^{2,3)}.

Caffeine이 각종 심장 및 순환기 질환과 연관되어 연구활동이 진행되고 있는 것은 caffeine이 심장 및 혈관의 수축작용에 커다란 영향을 미치기 때문이다. 그래서, 심장에 대한 caffeine의 작용은 지금까지 전기생리적 방법을 도입하여 여러 실험동물을 모델로 한 실험연구나 임상적인 연구활동을 통해서 규명하려 하였다^{5~8)}. 그 결과, caffeine이 심장에 끼치는 영향을 설명하기 위하여 몇가지 작용기전이 알려지게 되었다^{9~11)}. caffeine은 Sarcoplasmic Reticulum(SR)내로 calcium uptake를 방해하여 cytosol의 calcium농도를 증가시키고, phosphodiesterase의 활성을 억제시켜 교감신경의 자극과 같은 효과를 초래한다. 뿐만 아니라, 순환계 조절작용에 관여하는 adenosine 수용체에 길항작용을 유발하기도 한다.

그러나, 지금까지 생리적인 측면에서 심장의 기능수행, 관상 순환기능 및 심근의 산소대사에 대한 caffeine의 직접적인 작용에 관해서는 그 연구활동이 미비한 상태이다. 그러므로, 본 연구에서는 여러 가지 농도의 caffeine을 관상혈관내로 관류시킨 후에

시간의 경과에 따라 caffeine이 관상동맥 순환기능에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다. 또한, 관상동맥내의 calcium release를 측정하여 caffeine에 의해 초래되어지는 관상 순환기능의 변화상태를 관상혈관내의 calcium 농도와 어떠한 상관관계가 존재하는지를 조사하였다.

실험 방법

1. 심장의 분리와 관류

본 연구에서 사용되어진 guinea pig 심장의 분리와 관류방법은 심장의 생리학적 연구를 위해 이미 국제적으로 널리 이용되고 있는 *in vitro* 상태의 non-working Langendorff heart 관류방법을 도입하였다. 이 관류방법은 *in vitro* 조건에서 수행되어진다 하더라도 *in vivo* 조건에서 일어나는 심장의 모든 생리적 기능을 그래도 반영한다고 알려져 있다¹²⁾¹³⁾.

체중이 470±50g의 guinea pig 수컷에 heparin을 복강에 주사하고, 15분이 경과한 후에 마취제를 사용하지 않고 두개골에 충격을 가하여 실신시켜 해부하여, 심장을 관류 실험장치(Fig. 1,2 참조)에 guinea pig 심장을 연결시켰다. Fig. 1과 2에서 도식된 바와같이 관상동맥내압(Coronary Perfusion Pressure, CPP)을 80 cmH₂O로 고정시켜 놓고, 심장을 도관도입된 대동맥을 통해서 retrograde 형식으로 관류시켰다. 사용된 관류용액(perfusate)은 pH 7.40±0.03인 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로써, 37°C에서 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 gas를 가지고 균질화 시켰다. 이 관류용액의 성분 조성은 혈액의 것과 유사한 NaCl 127.5mM, KCl 4.7mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.2mM, NaHCO₃ 24.9mM이고, 여기에 에너지원으로 10 mM의 glucose를 첨가시켰다^{12,14)}. 도관도입된 대동맥으로 들어간 관류용액은 심장조직 사이사이에 분포되어 있는 관상동맥을 지나 도관도입된 폐동맥으로 나오게 된다.

2. 실험단계 설정

다른 2 종류의 관류용액이 담긴 reservoir 2개가

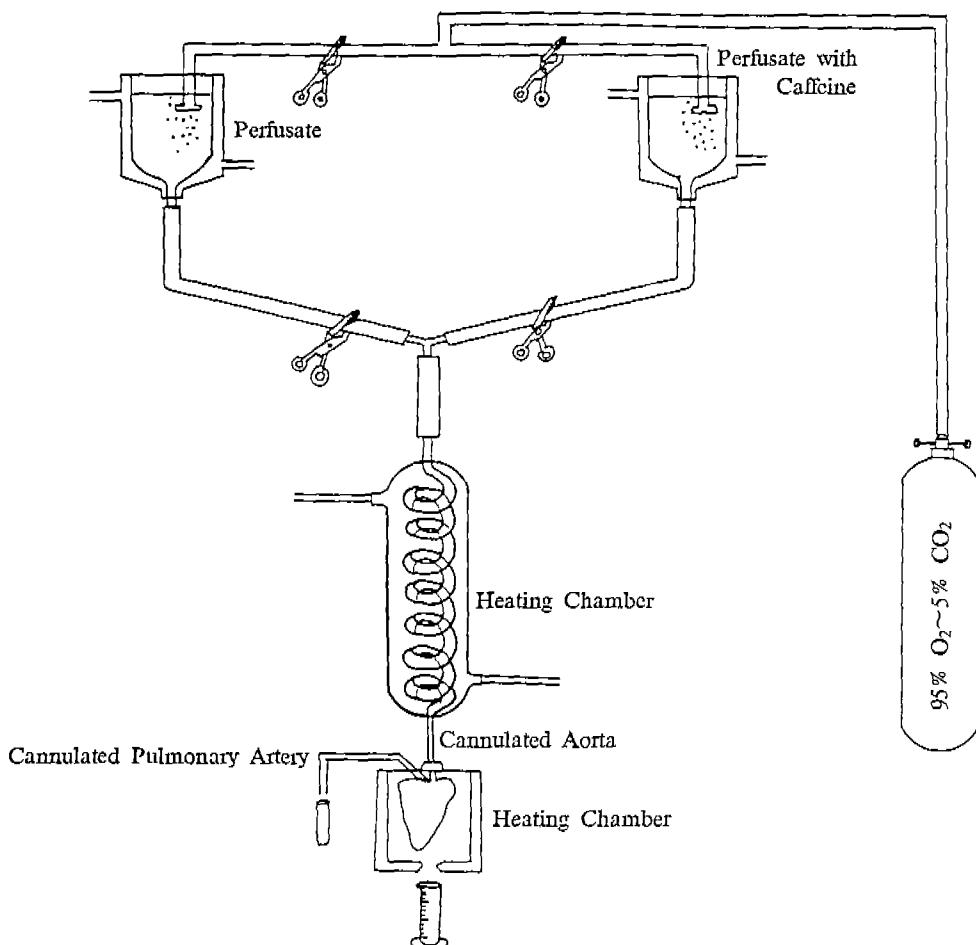


Fig. 1. Schematic diagram of non-working Langendorff heart perfusion apparatus with two different reservoirs.

각각 실험장치에 연결되었다(Fig. 1). 한 쪽의 reservoir에는 대조 용액인 Krebs-Ringer 관류용액을, 다른 쪽의 reservoir에는 caffeine을 $10^{-5}M$, $10^{-4}M$, 또는 $10^{-3}M$ 을 첨가시킨 관류용액을 각각 95% O_2 와 5% CO_2 혼합 gas를 가지고 37°C에서 균질화 시켰다. 심장을 관류장치에 연결시킨 후에, 관상동맥 내압을 80cmH₂O로 일정하게 고정시킨 상태에서(관상동맥 순환기능의 측정 본문 참조) 대조용액으로 관류시켰다. 정상적인 관상동맥 순환기능을 회복시키기 위하여 대조용액으로 10~15분간 정도 심장을 관류시킨 후(post-extraction stabilization period), 관상동맥 관류량(Coronary Perfusion Flow, CF)을 측정하고, 도관도입된 대동맥으로 들어간 관류용액

(inflow)과 관상동맥을 지나 폐동맥으로 흘러나온 coronary venous effluent(outflow)를 각각 sampling하여 Blood pH/Gas Analyzer(CIBA-CORNING, Model 238, Orangeburg, New York, U.S.A.)를 이용하여 anaerobic 상태에서 각각 pH, 산소 분압(Po_2)과 이산화탄소 분압(Pco_2)을 측정하였다.

측정이 끝나면, 대조용액에서 각 농도의 caffeine을 첨가한 관류용액으로 바꾸어 심장을 관류시켰다. 그런 후 1분 정도의 적응기간을 준 다음, caffeine용액으로 바꾼 후 2, 5, 10분의 관류시간이 경과할 때에, 위에서 언급된 것처럼 CF를 측정하고, 관류용액과 venous effluent의 pH, Po_2 및 Pco_2 를 각각 측정하였다.

관상동맥 순환기능과 Caffeine

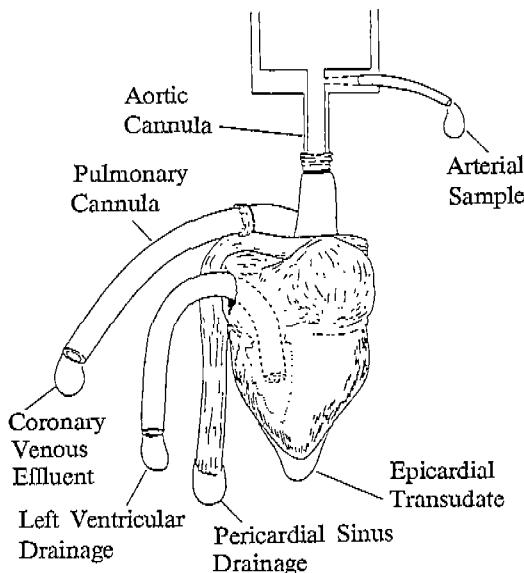


Fig. 2. Preparation with cannulated aorta and pulmonary artery. Arterial perfuse and coronary venous effluent sampling sites are indicated.

주어진 각각의 caffeine 농도에서 6마리씩의 guinea pig을 가지고서 본 실험을 수행하였다.

3. Coronary venous effluent의 calcium release 측정

위에서 언급된 정해진 시간에 관류용액과 venous effluent를 각각 따로 1ml씩 sampling 하여 Flamephotometer(CIBA-CORNING, Model 410, Halstead, Essex, England)를 이용하여 sampling된 관류용액과 venous effluent의 calcium 농도를 측정했다. 그런 후, 각각의 농도의 차(Δ calcium concentration)를 구하여 관상동맥내의 calcium release를 산술적으로 계산하였다.

Flamephotometer의 calcium 표준용액을 100ppm으로 만들었기 때문에, 관류용액과 venous effluent의 calcium 농도를 각각 ppm 단위로 구하고 이것을 물농도로 환산하였다. 관류용액의 calcium 농도는 2.5mM(심장의 분리와 관류 본문 참조)이므로, venous effluent의 측정된 calcium 농도와 관류용액의 2.5mM의 농도의 차가 caffeine에 의한 관상동맥내의 calcium release가 된다.

4. 관상동맥 순환기능의 측정

관상동맥의 내압(CPP)은 80cmH₂O로써 실험 전 과정의 기간동안 일정하게 유지되었다. 이 CPP는 도판도입된 대동맥에서부터 관류용액이 담긴 reservoir까지의 높이인 정수압을 말하는 것이다.

일정한 CPP의 조건하에서 caffeine이 관상동맥의 순환기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CF, 관상 혈관저항(Coronary Vascular Resistance, CVR), 심근 산소소비량(Myocardial Oxygen Consumption, MVO₂) 및 심근 산소추출비(Percent Myocardial Oxygen Extraction, % EO₂)를 측정하였다.

1) 관상동맥 관류량(CF)과 혈관저항(CVR)

측정된 CF는 심장의 단위 wet weight당 1분 동안에 관상동맥을 흐른 관류용액의 양으로써, 1분 동안에 폐동맥으로 나온 coronary venous effluent를 심장의 wet weight로 나눈 값이다. 그리고, CVR은 80cmH₂O의 CPP에 대한 CF의 비로 구하였다(저항=압력/유량). 이 실험에서 CPP는 일정하게 유지되었기 때문에, 만약 CVR이 감소하면 관상혈관은 확장하고(coronary vasodilation), 반대로 CVR이 증가하면 혈관은 수축한다고(coronary vasoconstriction) 간주된다.

2) 심근의 산소소비량(MVO₂)과 산소추출비(% EO₂)

여기서 MVO₂는 관류용액과 coronary venous effluent의 Po₂를 각각 측정하여 계산한다. 이 계산법은 Fick 공식을 이용한 것으로써, 전체 관상동맥을 단위 분당 흘러 지나간 CF에 심장이 단위 분당 소비한 산소량을 곱한 것으로 MVO₂를 계산하였다. 관류용액과 venous effluent 각각의 1ml의 산소함량은 각각의 Po₂에, 37°C에서의 산소 용해도인 0.0282μl O₂/mmHg을 곱한 값이다. 그러므로, 심장이 소비한 산소량은 관류용액의 산소함량에서 venous effluent의 산소함량을 뺀 값이다.

즉, MVO_2

$$= CPP \times [(Arterial Po_2 - Venous Po_2) \times 0.0282]$$

또한, %EO₂는 관류용액과 venous effluent의 산소함량의 차를 관류용액의 산소함량으로 나누어

백분율로 나타내었다.

5. 통계처리

본문에서 표기된 각각의 data는 means \pm S.E.로 나타내었다. 본 연구는 3가지 농도의 caffeine을 각각 첨가시킨 관류용액으로 Langendorff heart를 관류 시킨 후에, 관류시간이 경과함에 따라 caffeine에 의해 초래되는 관상동맥 순환기능의 변화상태와 calcium release의 반응효과를 통계처리하여 그 유의성을 비교 검증하려고 했다. 주어진 한 농도의 caffeine을 관류시킨 후에 시간적 경과에 따라 나타난 변화상태와 반응효과는 unpaired student's t-test 방법을 이용하여 대조용액으로 관류시켰을 때의 것과 각각 비교하였다¹⁵⁾. 한편, 각각 다른 농도의 caffeine으로 관류시켰을 때에 나타나는 변화상태와 반응효과를 서로간의 통계적 유의성을 비교하기 위하여, Two-way Analysis of Variance와 Least Significant Difference 방법을 이용하여 검증하였다¹⁵⁾. 모든 data의 유의성은 $p<0.05$ 에서 이루어졌다.

실험 결과

1. 관상동맥 관류량(CF)과 관상 혈관저항(CVR)에 대한 caffeine의 작용

본 연구에서 여러가지 농도의 caffeine을 10분간 관상동맥내로 관류시킨 후, 관류시간이 경과함에

따라 caffeine이 CF와 CVR에 어떤 작용을 하는지를 조사하였다. Table 1은 10^{-5} M, 10^{-4} M, 그리고 10^{-3} M의 caffeine을 대조용액에 각각 첨가시킨 caffeine 용액으로 Langendorff hearts를 관류시킨 다음, 2분, 5분, 10분이 경과할 때에 측정한 CF와 CVR에 어떤 변화상태가 초래하는지를 요약하였다.

주어진 각각의 농도로 caffeine을 10분간 관류시켰을 때, 모든 caffeine 농도에서 CF는 관류시간이 경과함에 따라 점차적으로 감소하였다. 특히, 5분이 경과할 때부터 CF는 caffeine이 첨가되지 않은 대조용액으로 관류했을 때보다 유의적인 감소현상을 나타내었다. 다시 말해서, caffeine농도와는 무관하게 CF는 5분이 경과시에는 10~12%, 그리고 10분이 경과시에는 15~21% 정도로 감소하였다. 뿐만 아니라, 고농도의 caffeine(10^{-3} M)을 10분간 관류시켰을 때의 CF가 감소하는 정도는 10^{-5} M의 caffeine을 관류시켰을 때의 그것과 비교하여 현저히 상승하였다($p<0.05$). 한편, 주어진 각각의 caffeine 농도에서 CVR은 caffeine의 관류와 함께 관류시간이 경과함에 따라 점차적으로 유의성을 나타내면서 증가하였다. 여기서, caffeine의 농도를 10^{-4} M 또는 10^{-3} M로 하여 10분간 관류시켰을 때에는 CVR이 10^{-5} M의 농도로 caffeine을 관류시켰을 때보다 상당히 큰 폭으로 증가하였다. 이와 같이, CF의 감소와 CVR의 증가현상은 일종의 dose-response를

Table 1. Effects of caffeine on coronary perfusate flow and coronary vascular resistance during 10 minutes after perfusion with caffeine.

[caffeine] M	0 min	2 min	5 min	10 min
CF(ml/min/g wet weight)				
10^{-5}	6.7 ± 0.2	6.4 ± 0.4	$6.0 \pm 0.2^*$	$5.7 \pm 0.3^*$
10^{-4}	6.8 ± 0.3	6.4 ± 0.4	$6.0 \pm 0.3^*$	$5.5 \pm 0.3^*$
10^{-3}	7.0 ± 0.2	6.7 ± 0.3	$6.2 \pm 0.3^*$	$5.5 \pm 0.4^{*,+}$
CVR(cmH ₂ O/ml/min/g wet weight)				
10^{-5}	10.9 ± 0.4	$12.0 \pm 0.7^*$	$12.8 \pm 0.4^*$	$13.0 \pm 0.6^*$
10^{-4}	11.0 ± 0.6	$12.1 \pm 1.0^{**}$	$12.6 \pm 0.7^{**}$	$13.7 \pm 0.6^{*,+}$
10^{-3}	10.6 ± 0.4	$11.5 \pm 0.6^*$	$12.2 \pm 0.6^*$	$13.6 \pm 0.8^{*,+}$

Data represents means \pm SE(n=6). Hemodynamic variables were collected during each time period after the administration of caffeine. [caffeine], caffeine perfusion concentration ; CF, coronary perfusate flow ; CVR, coronary vascular resistance.

* $p<0.05$, relative to corresponding 0 min(no caffeine) values.

+ $p<0.05$, relative to corresponding caffeine 10^{-5} M values.

관상동맥 순환기능과 Caffeine

나타내고 있으며, 관류시간에 따른 time-response를 보이고 있다.

본 실험에서 caffeine의 관류에 의한 직접적인 심장의 수행기능에 가해진 반응상태는 측정되지 않았지만, caffeine은 관류시간이 경과함에 따라 점차적으로 심장의 기능을 현저히 저하시키는 것을 발견할 수 있었다. 그러므로, caffeine은 CF의 감소와 더불어 심박동수감소(negative chronotropism)와 심실수축력의 저하(negative inotropism)를 초래하였다.

2. 심근의 산소소비량(MVO_2)과 산소추출비(% EO_2)에 대한 caffeine의 작용

Table 2에서는 각각 $10^{-5}M$, $10^{-4}M$, $10^{-3}M$ 의 농도로 caffeine을 대조용액에 첨가하여 Langendorff heart를

관류시켰을 때에 관류시간이 경과함에 따라 caffeine이 MVO_2 와 % EO_2 에 미치는 반응상태를 도표화하였다.

각각의 caffeine 농도에서 % EO_2 는 caffeine의 관류와 함께 10분 동안에 점차적으로 증가하였지만, 이와는 반대로 MVO_2 는 감소현상을 보였다. caffeine에 의한 MVO_2 의 감소현상에서도 dose-response의 관계를 나타내었다. 다시 말해서, $10^{-5}M$ 의 저농도의 caffeine을 관류하였을 때의 MVO_2 의 감소정도를 관류시간과 병행해서 비교하여 볼 때에 $10^{-4}M$ 의 caffeine 농도에서는 관류시간이 10분 경과하면 MVO_2 의 감소폭이 현저하게 커지고, 고농도의 caffeine에서는 5분이 경과할 때에 이것이 유의적인 결과를 초래하였다.

Table 2. Effects of caffeine on myocardial oxygen consumption and percent myocardial oxygen extraction during 10 minutes after perfusion with caffeine.

[caffeine]	0 min	2 min	5 min	10 min
% EO_2				
10^{-5}	63 ± 2	66 ± 2	$68 \pm 1^*$	$69 \pm 3^{**}$
10^{-4}	63 ± 3	67 ± 2	$69 \pm 3^*$	$71 \pm 1^*$
10^{-3}	65 ± 2	68 ± 2	$70 \pm 2^{**}$	$73 \pm 1^*$
MVO_2 ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ wet weight)				
10^{-5}	63 ± 2	61 ± 2	$58 \pm 2^{**}$	$56 \pm 2^{**}$
10^{-4}	64 ± 3	60 ± 3	$56 \pm 2^*$	$50 \pm 2^{**+}$
10^{-3}	67 ± 3	$61 \pm 2^{**}$	$55 \pm 2^{**+}$	$48 \pm 2^{**+}$

Data represents means \pm SE($n=6$). Hemodynamic variables were collected during each time period after the administration of caffeine. [caffeine], caffeine perfusion concentration ; % EO_2 , percent myocardial oxygen extraction ; MVO_2 , myocardial oxygen consumption. * $p < 0.05$, relative to corresponding 0 min(no caffeine) values. ** $p < 0.05$, relative to corresponding caffeine $10^{-5}M$ values.

Table 3. Perfusate pH as influenced by perfusion with caffeine during 10 minutes

[Caffeine]	0 min	2 min	5 min	10 min	
M	Units				
10^{-5}	pHa	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.02
	pHv	7.30 ± 0.01	7.28 ± 0.02	$7.41 \pm 0.01^{**}$	$7.41 \pm 0.02^{**}$
10^{-4}	pHa	7.39 ± 0.02	7.39 ± 0.01	7.39 ± 0.02	7.39 ± 0.02
	pHv	7.31 ± 0.02	7.30 ± 0.01	$7.28 \pm 0.01^{**}$	$7.25 \pm 0.01^*$
10^{-3}	pHa	7.42 ± 0.01	7.42 ± 0.01	7.42 ± 0.01	7.42 ± 0.01
	pHv	7.30 ± 0.01	7.27 ± 0.02	$7.25 \pm 0.02^{**}$	$7.23 \pm 0.03^{**+}$

Data represents mean \pm SE($n=6$). Each perfusate was sampled during each time period after the administration of caffeine. [caffeine], caffeine perfusion concentration ; pHa, arterial perfusate pH ; pHv, coronary venous perfusate pH. * $p < 0.05$, relative to corresponding 0 min(no caffeine) values. ** $p < 0.05$, relative to corresponding $10^{-5}M$ values.

Table 4. Effects of caffeine on calcium release in coronary venous effluent during 10 minutes after perfusion with caffeine.

[caffeine]	0 min	2 min	5 min	10 min
M		Δ calcium concentration(μM)		
10^{-5}	0.16 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.04
10^{-4}	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.16 ± 0.03
10^{-3}	0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.05 ^{**}	0.37 ± 0.04 ^{**}	0.46 ± 0.04 ^{**}
		calcium release(nmol/min/g wet weight)		
10^{-5}	1.07 ± 0.22	1.09 ± 0.06	1.02 ± 0.12	0.91 ± 0.23
10^{-4}	1.09 ± 0.22	1.15 ± 0.13	1.20 ± 0.06	0.88 ± 0.17
10^{-3}	1.19 ± 0.16	1.16 ± 0.34 ^{**}	2.29 ± 0.25 ^{**}	2.53 ± 0.22 ^{**}

Data represents means ± SE ($n=6$). Perfusate samples were collected during each time period after the administration of caffeine. [caffeine], caffeine perfusion concentration; Δ calcium concentration, coronary venous effluent minus arterial perfusate calcium concentration; calcium release was calculated with Δ calcium concentration and coronary perfusate flow. * $p<0.05$, relative to 0 min (no caffeine) values.

coronary venous effluent의 pHv에 대한 caffeine의 작용은 Table 3에서 요약되었다. 관류용액을 실험 과정의 전기간에 걸쳐서 95% O₂와 5% CO₂의 gas로 균질화 시켰기 때문에 그 결과로 관상동맥으로 흘러 들어간 관류용액의 pH(pHa)는 7.40 ± 0.03으로 유지되었다.

Table 3에서 본 바와 같이, 도관도입된 폐동맥으로 흘러 나온 coronary venous effluent의 pHv는 caffeine의 관류에 의해 점차적으로 감소하였다. 뿐만 아니라, 고농도의 caffeine을 10분간 관류시켰을 때의 pHv는 10^{-5} M의 caffeine을 관류시켰을 때와 비교하여 보면 상당히 저하되었다($p<0.05$). 이러한 pHv의 변화는 caffeine이 직접적으로 심장의 metabolic acidosis를 초래한다는 것을 알 수 있다. 여기서, venous effluent의 pHv의 변화는 단순히 실험 조작과정에서 인위적인 결과로 인해 심장의 기능이 저하하면서 유발되었다고 볼 수 없다.

3. 관상동맥내의 calcium release에 대한 caffeine의 작용

각각의 농도로 caffeine을 첨가시킨 관류용액으로 관류시킨 후, 2분, 5분, 10분이 경과할 때에 sampling한 관류용액과 coronary venous effluent의 calcium 농도를 각각 측정하여 Δ calcium concentration를 구하고, 여기에 CF를 곱하여 calcium release를 계산하였다.

coronary venous effluent의 calcium release에 대한 caffeine의 작용은 Table 4에서 요약되었다. caffeine을 10^{-4} M 이하의 농도로 관상동맥내로 관류시켰을 때의 calcium release는 대조용액의 관류시와 비교하여 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 그러나, 고농도의 caffeine은 관류시간이 경과함에 따라 점차적으로 calcium release를 증가시켰다. Table 1에서 본 바와 같이, 비록 CF가 10^{-3} M caffeine의 관류에 의해 현저히 감소하였다 할지라도, 10^{-3} M의 caffeine은 coronary venous effluent의 Δ calcium concentration에 막대한 상승을 초래하여서 calcium release는 여전히 유의적인 증가현상을 보였다.

고 칠

본 연구에서는 관상동맥에 caffeine의 관류를 통하여, 일정한 관상동맥내압의 상태에서 caffeine이 Langendorff guinea pig heart의 관상 순환기능과 심근의 산소소비량에 어떤 작용을 하는지를 조사하였다. 신경성, 체액성 내지는 혈액에서 오는 여러가지 작용요인들을 배제한 이 Langendorff heart preparation을 이용하여 3 가지 농도의 caffeine을 10분간의 계속적인 관류형식으로 관상동맥내로 관류시켰다. caffeine은 세포내의 Sarcoplasmic Reticulum으로부터 calcium을 고갈시키는 작용을 한다고 알려져 있기 때문에^{[16][17]}, 본 연구는 cal-

feine의 관류에 의한 심근의 calcium release를 조사하기 위하여 coronary venous effluent의 calcium concentration과 calcium release도 동시에 측정하였다.

1. 관상동맥의 순환기능에 대한 caffeine의 작용

관류된 caffeine의 농도와는 무관하게 caffeine은 관상 관류량을 감소시키면서, 동시에 관상 혈관저항을 현저히 증가시켰다. 본 실험에서 이용된 Langendorff heart의 preparation은 관상동맥의 내압이 실험과정의 전 기간동안에 80cmH₂O로 일정하게 유지되었기 때문에, caffeine에 의해 초래된 관상 관류량의 감소와 혈관저항의 증가현상은 caffeine이 관상혈관에 대해서 vasoconstrictor 작용을 가지고 있다고 해석할 수 있다. 또한, caffeine의 coronary vasoconstrictor 작용은 관상혈관내로 관류된 caffeine의 농도에 따라 그 작용정도가 다르게 나타나면서 일종의 dose-response의 관계를 유지하였다.

심근의 산소소비량과 관상 혈류량의 서로 상호간에는 직접적인 상관관계가 성립한다는 것은 잘 알려진 사실이다¹⁸⁾¹⁹⁾. 심장에 가해진 어떤 자극요인에 의해서 초래된 심근의 산소소비량의 변화는 심장에 공급되는 산소량의 변화에 기인한다고 본다. 이런 자극요인은 심근의 산소 추출량을 증가시키고, 더불어 산소 공급량을 증가시켜 산소소비량을 자극이 가해진 이전의 수준으로 유지시키며 한다. 그러나, 분명히 심근의 산소 추출량이 증가한다 할지라도 심근의 산소 요구량과 산소공급량 사이에는 불균형이 초래될 수 있다. Bardenheuer와 Schrader¹⁸⁾는 심근의 adenosine 형성을 유발시키는 주된 요인이 심근의 대사량 보다는 오히려 산소 공급과 산소요구의 불균형이라고 보고하였다. adenosine은 ATP의 분해산물로써 강력한 vasodilator이라고 알려져 있는데, 순환계의 혈류량을 국소적인 차원에서 조절작용을 수행한다고 한다¹⁹⁾.

coffeeine에 의한 관상 관류상의 감소현상은 심근에 산소공급을 저하시킨다. 이로써, 관류량의 감소로 인한 산소공급의 불균형을 해소하기 위해서 심근의 내재적 작용인 산소추출량을 증가시켜 심근의 산소공급을 향상시켰다. 비록 vasoconstrictor 작용을

가진 caffeine이 관류된다 할지라도, 심근의 산소공급의 향상에 의해서 심근의 산소소비량은 감소되지는 않을 것이다. 그러나, 본 실험에서 caffeine에 의한 산소소비량의 점차적이고 유의적인 감소현상은 산소추출량이 상당히 증가하였다 할지라도 그 증가량은 한정되고 불충분하다는 것을 말해주고 있다. Bardenheuer와 Schrader의 연구논문¹⁸⁾의 보고를 인용하면 이런 경우에, 관상혈관내로 adenosine과 같은 vasodilator들을 유리시켜 관상혈관을 확장하여 관상 관류량을 증대시키려 할 것이다. Fredholm¹¹⁾은 adenosine 수용체를 방해시키는 물질인 theophylline을 사용하여 caffeine이 adenosine 수용체에 대해서 억제작용을 한다는 사실을 규명하였다. 이로써, caffeine에 의한 산소대사의 불균형이 초래되면서 adenosine이 유리된다고 할지라도 그것의 작용은 무효화되어 관상 관류량은 증가하지 않고, 단지 caffeine에 의한 vasoconstriction 현상만 나타난다고 할 수 있다. 뿐만 아니라, caffeine이 관상동맥의 혈관내로 vasoconstrictor 작용을 가진 여러 내재성 물질들을 유리시켜 간접적으로 caffeine의 vasoconstriction 현상을 초래할 수도 있다는 가능성도 생각할 수 있다.

이와같이 관상동맥의 내압이 80cmH₂O인 상태에서, caffeine의 관류는 관상 순환기능과 심근의 산소대사 작용에 큰 변화를 초래하였다. 이러한 변화는 caffeine에 의한 inotropism과 chronotropic의 변화에 이차적으로 작용하는 것으로 보여진다. 다시 말해서, 본 실험에서 초래된 Langendorff heart의 negative inotropism은 일부는 caffeine의 직접적인 vasoconstrictor작용으로 돌릴 수 있다. 달리, caffeine의 관류로 인해 내재성 원인인 vasoconstrictor 물질들이 유리되어 이런 물질들이 간접적으로 negative inotropism 작용을 유발할 수도 있다는 사실을 배제할 수는 없다. caffeine의 관류시간이 길어질수록 또는 고농도의 caffeine은 심근의 산소소비량을 더 한층 감소시키는데, 이것은 심장의 수행기능의 현저한 저하로 인하여 산소요구량이 감소하는 것으로 설명되어질 수 있다.

2. Caffeine의 coronary vasoconstrictor 작용에 대한 calcium의 역할

caffeine에 의해 초래된 coronary vasoconstriction의 작용기전은 본 연구에서 확실하게 규명되어지지 않았다. 많은 연구보고에 의하면, caffeine은 tachycardia, cardiac arrhythmias을 유발시키는 것으로 알려져 있다³⁾⁸⁾⁹⁾. 심장에 가해진 이러한 caffeine의 작용을 설명하기 위하여 여러가지 작용기전이 제시되었다^{9~11)16)}.

caffeine은 세포내에 있는 SR의 calcium 저장고를 고갈시키는 작용을 가지고 있으며, 또한 cytosol에 calcium을 축적시켜 calcium의 재회로를 방해한다^{16~17)}. caffeine은 직접 SR의 calcium channel을 열어서 calcium release를 유도하는데, 이것은 caffeine이 SR의 ryanodine 수용체에 작용하므로 써 이 투어진다¹⁷⁾. 또한, 간접적인 기전으로 caffeine은 cytosol의 phosphodiesterase를 억제시켜 cAMP의 수준을 높이고, 그 결과로 calcium channel의 phosphorylation이 증가하여 세포내로 calcium이 다량 들어오게 한다¹⁷⁾. 이 후자의 calcium 증가현상에 대한 caffeine의 간접적인 작용기전으로 인해 arrhythmias를 유발시키며, positive inotropism을 나타내는 것 같다.

위에서 언급된 바와같이, caffeine은 coronary vasoconstriction과 심근의 산소소비량의 유의적인 감소현상을 초래하였다. 뿐만 아니라, 이와 병행하여 10^{-3} M의 고농도의 caffeine은 관상동맥내로 calcium release를 증가시켰다. 비록 고농도의 caffeine은 관상관류량의 유의적인 감소현상을 초래하였다 할지라도, 관상동맥내의 Δ calcium concentration의 절대적 수치의 현저한 증가로 인하여 calcium release를 상승시켰다. 고농도의 caffeine에 의한 vasoconstriction은 다음과 같이 설명되어질 수 있다. 고농도의 caffeine에 의한 관상동맥내의 calcium 농도의 상승으로 말미암아, 관상혈관의 vascular smooth muscle (VSM)의 calcium channel을 통해 calcium이 유입되어 VSM의 actin과 myosin의 결합을 촉진시켜 VSM를 수축시키고, 그 결과로 관상혈관은 수축하고 관상 혈관저항은 상승하게 된다. 이와는 달리,

10^{-4} M와 10^{-5} M의 caffeine은 vasoconstrictor작용과 심근의 산소소비량의 감소현상을 유발시켰지만, calcium release는 증가시키지 않았다. 그러므로, caffeine에 의한 coronary vasoconstriction은 관상혈관내에서 caffeine의 직접적인 작용에 의해 초래되고, 고농도의 caffeine인 경우에는 관상동맥내의 calcium에 의하여 vasoconstriction은 더 한층 심화되었다고 볼 수 있다.

한편 다른 연구논문¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾에 의하면, 저농도의 caffeine은 SR 자체의 calcium release에 아무런 영향을 주지 않고, $5\text{--}10$ mM의 고농도의 caffeine이 SR에 가해지면 SR의 release channel을 열어서 calcium release는 촉진시키고, 또한 SR의 calcium에 의한 calcium release기전에 민감하게 작용한다고 한다. 이러한 사실은 본 실험의 결과에 의해서도 규명되었다. 본 실험에서 Langendorff heart에 caffeine을 10^{-3} M의 농도로 관류시켰을 때에만 관상동맥내의 calcium release를 증가시키고, 10^{-4} M이하의 caffeine의 경우에는 calcium release가 caffeine이 첨가되지 않은 대조용액에서의 release와 유의적인 차이가 없었다.

심근의 cytosol에 어떤 원인으로 cytosol의 calcium 농도의 위험수치를 초과할 정도로 calcium이 다량 축적되면, calcium을 세포밖으로 내보내게 된다²¹⁾. 이것은 cytosol의 diastole의 calcium농도를 어느 수준으로 유지하기 위하여, sarcolemmal sodium-calcium exchange 기전과 sarcolemmal calcium pump 기전이 활성화되어 calcium을 세포밖으로 내보내게 하는 것이다²¹⁾²²⁾. 심장이 diastole 상태에 있을 경우, 심근의 cytosol의 calcium 농도는 $0.3\mu\text{M}$ 정도로 유지한다고 알려져 있다²¹⁾. 본 실험의 결과에서 보면, 정상적인 경우에 관상동맥내의 Δ calcium concentration과 calcium release는 각각 $0.16\mu\text{M}$ 과 $1\text{nmol}/\text{min/g wet weight}$ 이다. 그러나, 10^{-3} M의 caffeine은 이런 수치를 2배 이상 증가시켰다. 이것은 caffeine이 SR로부터 calcium의 유리를 촉진시켜 다량의 calcium이 cytosol에 축적되어 위에서 언급된 calcium efflux 기전이 활성화되어 관상혈관내로 calcium release가 증가하게 되었다고 본다.

이와같이 caffeine에 의한 cytosol에 calcium 축적

관상동맥 순환기능과 Caffeine

은 cytosol의 calcium overload를 초래할 수 있다. 고농도의 caffeine이 관류되면 calcium release가 현저히 상승하였지만, cytosol도 상당한 calcium overload 상태일 것이다. 본 실험에서는 caffeine 관류 시의 intracellular calcium 농도는 측정되어지지 않았다. 과다한 catecholamine 자극, 허혈성 심질환과 재관류의 경우에 calcium overload가 발생한다. 이 때에 calcium overload가 심장에 끼치는 병리적인 효과에 대해서 몇 가지 사실이 제시되었다²³⁾²⁴⁾. Fleckensein²³⁾에 의하면, calcium의 증가상태에 대응하여 수축기전의 활동이 증가하면서 과다의 ATP를 분해시키므로 calcium overload는 심근세포를 손상시킬 수 있다고 제시하였다. 또한, 과다한 calcium은 세포막을 파괴시키는 phospholipase효소를 자극시켜 세포막에 손상을 가져올 수 있다고 하였다. 그 외에도 calcium overload는 ATP의 재합성을 위한 산소 요구가 증대하여 산소대사의 불균형을 유발시키며, 지속된 과다의 수축현상을 초래한다고 한다²³⁾. Duncan과 Smith²⁵⁾는 caffeine이 직접 수축작용에 관여하는 actin-myosin matrix에 작용한다는 사실과 함께, caffeine은 세포내로 유입되어 actin-myosin 구조에 비가역적인 손상을 유발시킨다고 보고하였다.

요약 및 결론

본 연구를 수행한 목적은 caffeine을 관상동맥내로 관류시켰을 때에 초래되는 관상 순환기능과 심근의 산소소비량의 변화상태를 조사하고, caffeine에 의한 심장의 기능변화에 대해서 calcium의 역할을 규명하기 위함이다.

체중이 470 ± 50 g인 guinea pig 수컷의 심장을 non-working Langendorff heart의 관류방식인, 80 cmH₂O의 관상동맥의 내압으로 고정시킨 상태에서 도관도입된 대동맥을 통해서 retrograde 형식으로 관류시켰다. 사용된 대조 관류용액은 pH7.40 \pm 0.03의 Krebs-Ringer bicarbonate 용액으로써, 37°C에서 95% O₂와 5% CO₂의 혼합 gas를 가지고 균질화시켰다. 또한 caffeine의 작용을 규명하기 위하여 이 대조

용액에 caffeine을 10^{-5} M, 10^{-4} M, 또는 10^{-3} M의 농도로 첨가시켜 10분간 관류시켰다. caffeine이 심장에 끼치는 작용을 알아보기 위해서 측정된 관상 순환기능으로는 caffeine이 10분간 관류되는 동안의 관상관류량, 관상혈관저항, 심근 산소소비량 및 산소추출비 등이다. caffeine에 의해 나타난 이러한 관상순환기능의 변화상태를 관상동맥내의 calcium과의 연관성을 규명하기 위해 caffeine이 관류하는 동안에 calcium release를 조사하였다.

caffeine을 10분간 관류시키는 동안에 점차적으로 관상관류량은 감소하였으며, 반면에 관상 혈관저항은 상승하였다. 이러한 현상은 관류된 caffeine의 농도가 쿨수록 현저하였다. 한편, caffeine에 의한 관상동맥 자체내의 산소추출량이 증가하였다 할지라도 더 큰 폭의 관상 관류량의 감소로 인하여 caffeine은 심근의 산소소비량을 유의적으로 감소시켰다. 관류된 caffeine의 농도에 따라 calcium release는 증가하는 현상을 보였으며, 본 실험에서 고농도인 10^{-3} M의 caffeine을 관류시켰을 때에는 calcium release가 10분간의 관류시간이 경과함에 따라 크게 증가하였다.

이러한 결과를 종합하여 보면, caffeine은 그 자체의 관상혈관에 대한 vasoconstrictor작용을 가지고 있는 것으로 보인다. 고농도의 caffeine은 관상동맥내의 calcium release를 점차적으로 증가시켜 이러한 vasoconstrictor작용을 심화시켰다. caffeine에 의해서 수반되어진 negative inotropism은 부분적으로나마 caffeine의 vasoconstrictor작용에 의한 것으로 추정된다.

Literature cited

- 1) 한국인구보건연구원, 한국인의 영양권장량 : 한국인을 위한 식사지침, 제 5차 개정, 고문사, 1989
- 2) Gruboys TB, Diederick E, Rimm EB, Giovannucci E. Coffee, caffeine and cardiovascular disease in men. *N Engl J Med* 323 : 1026-1032, 1990
- 3) Myers MG. Caffeine and cardiac arrhythmias. *Ann Intern Med* 114 : 147, 1991
- 4) Jeong D-u, Joel E. The effects of caffeine on blood pressure in the work environment. *Am J Hypertens*

- 3 : 749-753, 1990
- 5) Bellet S, Horstmann E, Roman LR, DeGuzman NT, Kostis JB. Effect of caffeine on the ventricular fibrillation threshold in normal dogs and dogs with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 84 : 215-227, 1972
 - 6) De Beer DL, Grundeman RLF, Wilhelm AJ, Caljouw CJ, Klepper D, Schiereck P. Caffeine suppresses length dependency of Ca^{2+} sensitivity of skinned striated muscle. *Am J Physiol* 254 : C491-C497, 1988
 - 7) Dobmeyer DJ, Stine RA, Leier CV, Greenberg R, Schaal SF. The arrhythmogenic effects of caffeine in human beings. *N Engl J Med* 308 : 814-816, 1983
 - 8) Newcombe PF, Renton KW, Rautaharju PM, Spencer CA, Montague TJ. High-dose caffeine and cardiac rate and rhythm in normal subjects. *Chest* 94 : 90-94, 1988
 - 9) Lin CL, Vassalle M. Role of calcium in the inotropic effects of caffeine in cardiac purkinje fibers. *Int J Cardiol* 3 : 421-434, 1983
 - 10) Scholz H. Inotropic drugs and their mechanisms of actions. *J Am Coll Cardiol* 4 : 389-397, 1984
 - 11) Fredholm BB. On the mechanism of action of theophylline and caffeine. *Acta Med Scand* 217 : 149-153, 1985
 - 12) Bunger R, Haddy FJ, Querengasser A, Gerlach E. An isolated guinea pig heart preparation *in vivo*-like features. *Pflugers Arch* 353 : 317-326, 1975
 - 13) Kang YH, Wei HM, Fisher H, Merrill GF. Histamine-induced changes in coronary circulation and myocardial oxygen consumption : Influence of histamine receptor antagonists. *FASEB J* 1 : 483-490, 1987
 - 14) Mallet RT, Hartman DA, Bunger R. Glucose requirement for post-ischemic recovery of perfused working heart. *Eur J Biochem* 188 : 481-493, 1990
 - 15) Sokol RR, Rohlf FJ. The principles and practice of statistics in biological research. In : Emerson R, Kennedy P, Parks RB(eds.) Biometry. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1969
 - 16) Hunter DR, Haworth RA, Berkoff HA. Cellular calcium turnover in perfused rat heart. *Circ Res* 51 : 363-370, 1982
 - 17) Sitsapesan R, Williams AJ. Mechanisms of caffeine activation of single calcium release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Physiol* 423 : 425-439, 1990
 - 18) Bardenheuer H, Schrader J. Supply to demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by the heart. *Am J Physiol* 250 : H173-H180, 1986
 - 19) Knabb RM, Ely SW, Bacchus AN, Rubio R, Berne RM. Consistent parallel relationships among myocardial oxygen consumption, coronary flow, and pericardial infuse adenosine concentration with various interventions and β -blockade in the dog. *Circ Res* 53 : 33-41, 1983
 - 20) Rasmussen CAF, Sutko JL, Barry WH. Effects of ryanodine and caffeine on contractility, membrane voltage, and calcium exchange in cultured heart cells. *Circ Res* 60 : 495-504, 1987
 - 21) Carafoli E. How calcium crosses plasma membranes including the sarcolemma. In : Opie LH(ed.) Calcium antagonists and cardiovascular disease. New York, Raven Press, 29-41, 1984
 - 22) Marban E, Rink TJ, Tsien RW, Tsien RY. Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca^{2+} -sensitive microelectrodes. *Nature* 286 : 845-850, 1980
 - 23) Fleckenstein A. Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In : Harris P, Opie LH(eds.) Calcium and the heart. London, Orlando, New York, Academic Press, 135-188, 1971
 - 24) Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 66 : 135-146, 1990
 - 25) Duncan CJ, Smith JL. The action of caffeine in promoting ultrastructural damage in frog skeletal muscle fibers : Evidence for the involvement of the calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 305 : 159-166, 1978