

심방이노호르몬의 분비조절에 있어서 superoxide anion의 영향

강창원 · 김남수 · 이호일

전북대학교 수의과대학
(1995년 9월 28일 접수)

Effect of superoxide anion in the regulation of atrial natriuretic peptide(ANP) secretion

Chang-won Kang, Nam-soo Kim, Ho-il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
(Received Sep 28, 1995)

Abstract : Atrial Natriuretic Peptide(ANP) is a hormone with potent natriuretic, diuretic and relaxing properties of vascular smooth muscle. Specific chemical modulator responsible for the ANP secretion has not yet been found. Although atrial stretch of stretch-release is to be a major stimulus for the secretion of ANP, the precise mechano-molecular transduction mechanism responsible for its evoked secretion remains to be elucidated. It is interested to clarify the effect of superoxide anion in the stretch-induced ANP secretion. In order to investigate the effect of H_2O_2 in the regulation of ANP secretion, a perfused model of left atrium of rats was used. The results obtained were as follows;

1. The ANP secretion and the extracellular fluid(ECF) translocation were accentuated by the effect of repetitive atrial distension-reduction volume at atrial pressure(4cmH₂O).
2. The dilution curve showed to be in parallel between pure atriopeptin III(AP III) and perfused buffer.
3. $H_2O_2(5 \times 10^{-4}M)$ accentuated a stretch-release induced increase of the ANP secretion. The amount of released ANP was significantly($p < 0.01$) increased. These results suggest that the superoxide anion may be involved in the regulatory mechanism of mechanically activated ANP release.

Key words : ANP, superoxide anion, atrium, ECF.

서 론

개의 심장에 존재하는 수용체가 세포외액의 조절과 깊은 관련이 있다고 Henry 등이 보고한 이래 Kisch는 심방근 세포내에서 독특한 분비과립이 존재함을 보고하였으며, 1964년 Jamieson 등은 심방근의 근수축기능 이온에도 특수과립을 함성하고 분비

하는 기능도 가지고 있을 것이라는 추정을 하였다. 1976년 Marie 등과 1973년 De Bopld는 심방근 세포내의 특수 분비성 과립이 수분 및 전해질 대사와 관련이 있다고 보고하였다.

1981년 De Bold 등은 심방 추출액을 래트의 정맥내 투여하여 사구체 여과율의 변화없이 신속하고 강력한 이뇨 및 Na⁺ 배설증가효과를 관찰하고 이것을 심방근 세포의 특수과립분비에 의한 것이라고 주장

Address reprint requests to Dr Chang-Won Kang, College of Veterinary medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.

하였다. 이 효과는 이때까지 알려진 다른 내재성 "natriuretic factor"에 의한 것보다도 강력한 것이었다. 그후 이 물질은 atrial natriuretic hormone, atrial natriuretic factor, atriopeptin 등으로 명명되었다. 그후 여러 연구자들에 의해 혈액 중으로 분비되는 ANP는 혈관을 이완시켜 혈압을 하강시키는 작용, 신장에 작용하여 이뇨 및 Na^+ 배설을 증가시키는 작용, 모세혈관 투과성을 증가시켜 혈관내의 물을 조직간 질액(interstitial fluid, ISF)으로 이동시키는 작용 그리고 renin 및 aldosterone 등의 호르몬 분비억제작용 등이 발견됨으로써 ANP에 대한 생리적 기능 즉, atrial natriuretic peptide(ANP) 작용효과의 다양성이 제시되었다. 또한 ANP는 심실을 포함한 심장 뿐만 아니라 신경계, 순환기계, 뇌하수체, 부신 및 성선 등 심장 이외의 장기에도 널리 분포하고 있음이 알려졌다⁷⁸. ANP의 Prepro-form은 150~152개의 아미노산으로 구성되어 있고, 이 중 24~25개는 signal peptide이며 나머지 126개의 아미노산이 prohormone으로 분비성 과립내에 저장되어 있다가 자극이 오면 분비과정 중에 c-terminal의 24~28개의 아미노산으로 구성된 peptide가 active hormone으로 분비됨이 밝혀졌다^{79,80}. ANP의 생화학적 특성은 생리적 기능의 발현에 필수적이라고 알려진 2개의 cysteine에 의해 환상구조를 이루고 있으며, ANP 아미노산 서열은 12번의 아미노산이 종에 따라 methionine(사람, 소, 개)이거나 isoleucine(가토, 개, mouse)인 것을 제외하고는 대개 비슷하다.

심장으로 부터의 ANP 분비는 심장의 확장(distension)에 의하여 촉진될 수 있음이 제시된 이래^{9,11,12}, 심방내압의 증가¹¹⁻¹⁴, 심박동수의 증가^{4,15-21} 또는 adrenergic¹¹⁻¹⁴, cholinergic drug¹¹ 및 몇가지 peptide hormone¹¹⁻¹⁴ 등의 자극으로 분비된다고 알려져 있다. 그러나 심방내압의 증가가 ANP 분비의 직접적인 요인이 될 수 없음을 cardiac tamponade에서 심방내압의 증가에도 불구하고 ANP 분비의 증가를 항상 동반하고 있지 않다는^{16,22-23}과 제시된 바와 있으며, 이는 ANP의 분비증가를 일으키는 데는 또 다른 요인이 동반되어야 함을 의미하고 있는 것이다. 지금까지의 연구에서 ANP 분비의 확실한 자극요인은 심방의 확장임이 알려져 있다. 그러나 Cho 등^{23,24}은 ANP 분비에 있어서 심장의 확장 자체로써는 ANP 분비증가를 일으킬 수 없으며, 확장후 심방의 축소에 의하여 ANP의 분비가 나타나고, ANP 분비량은 확장후 축소용적의 크기에 따라 결정된다고 심방관류 모형을 이용하여 주장하였다²⁴. 그들은 더 나아가 심방의 확장이 항상 동반하는 심방내압의 증가

또는 심박동수 변동 등 ANP 분비촉진의 가장 중요한 세가지 요인의 상대적인 중요성을 구명하고자 하는 과정에서 이 세가지 요인에 의한 ANP 분비기전은 모두 공통적으로 심장의 확장후 축소를 내포하며 이때의 용적변화에 의하여 정량적으로 영향을 받고 있음을 제시하였다¹⁵. 이들은 심장으로 부터의 ANP의 분비는 심방세포로 부터 intercellular space로의 ANP 유리단계와 심방근세포의 축소에 의하여 유리된 ANP가 세포간질액과 더불어 심방강내로 이동하는 ANP 분비의 단계 즉, 이 두단계로 이루어진 "sequential mechanism"^{15,27}을 제시하였다. 이러한 새로운 사실로 볼 때 inotropic 또는 chronotropic 효과가 있는 신경전도물질 및 호르몬 등에 의하여 구명된 ANP 분비기전에 관한 주장들은 다시 검토될 수도 있을 것이다.

생리적인 세포기능의 조절기전 중에는 phosphoinositide 대사에 의한 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DAG)의 생성이 중요하다는 것은 이미 밝혀진 바 있으며²⁸⁻³¹, myocardial phospholipase D는 심방세포의 sarcolemma에 위치하고 이 물질은 심장의 Ca^{++} 변동에 영향을 주고 있으며, oxidative stress에 의하여 영향을 받고 있다는 사실이 보고³²된 바, 본 연구는 ANP의 분비기전에는 심방근의 stretch가 관련되었다는 가정하에 심방근의 기계적 자극에 의한 ANP 호르몬 분비조절에서 superoxide anion의 관련유무를 밝히고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

이 연구에 사용한 실험동물은 건강하다고 인정되는 체중 250~350g의 Sprague-Dawley계 래드 암컷을 사용하였다. 적출심방 관류모형으로는 ANP 분비와 extracellular fluid(ECF) translocation의 변화를 동시에 측정할 수 있도록 고안된 Cho 등²³ 및 Seul 등²⁴의 방법을 발전시킨 모형이다. 분비된 ANP는 방사면역 측정법(radioimmunoassay)을 이용하여 측정하였으며, 심방근 세포외액 이동량의 측정은 ³H-inulin clearance²⁵로 측정하였다.

적출심방 관류모형: 심방 관류모형은 래드를 guilotine을 사용하여 희생시킨 다음, 신속히 적출한 심장을 산소로 포화시킨 36.5°C의 생리적 식염수에 옮기고, 좌측심방을 조심스럽게 분리하여 심장적출로 인한 심방내 공기방울의 발생을 방지할 수 있도록 만든 분리형 probe tip에 좌측심방을 놓고 봉합사(No. 5~0)로 신속하게 고정시켰다. 분리형 probe는

head부분과 tip부분이 서로 분리될 수 있도록 고안하여 polyethylene tubing(19G) 3개를 그 내부에 매몰시켜 만들었다. 외경이 5mm인 분리형 probe tip을 심방내 1mm 깊이까지 넣어 고정시킨 후 3개의 작은 관중 하나는 영양액을 심방내로 주입하는데 또 다른 하나는 관류 후 심방밖으로 내보내는데 그리고 남은 관은 pressure transducer를 이용하여 심방내 압력을 측정하는데 사용하였다. 분리형 probe tip에 고정된 좌심방은 곧 36.5°C의 organ chamber에 옮겨 고정시켰다. Organ chamber는 36.5°C 온도를 유지시키고, 심방의 pericardial side로 부터 atrial lumen으로 이동하는 extracellular fluid(ECF) translocation의 변화를 측정할 수 있도록 pericardial space에는 ^3H -inulin을 포함한 영양액을 넣었으며 silicone관을 통하여 O_2 와 CO_2 를 공급하며, 영양액의 pH를 유지하였다. 관류액이 심방내로 주입되기 바로 전에 air trap을 10ml의 tube에 설치하여 적출 심방내로 기포의 유입을 차단하였다. Air trap의 buffer 양을 조절함으로써 peristaltic pump에서 오는 기계적 자극에 의한 pulse를 보다 더 줄임으로써 ANP의 분비양상을 일정하게 할 수 있었다. 수출관의 tip을 4cm를 올려 심방내압을 증가시킴에 따라 심방의 확장을 일으켰다. 영양액인 Krebs-Henseleit bicarbonate 완충액의 조성은 다음과 같다. NaCl 118.0mM, KCl 4.7mM, CaCl_2 2.5mM,

KH_2PO_4 1.2mM, MgSO_4 1.2mM, NaHCO_3 25.0mM, glucose 10.0mM 그리고 0.1 bovine serum albumin(BSA)을 첨가하여 사용하였다. 처리군은 Krebs-Henseleit bicarbonate 완충액에 H_2O_2 를 함유시켰다. 심방은 peristaltic pump를 이용하여 0.25ml/min의 속도로 심방내강에 관류액을 관류시켰다. 관류 영양액은 CO_2 와 O_2 의 gas-mixing chamber내에 설치된 내경 1mm, 길이 30cm의 silicone관을 통과하면서 산소와 탄산가스의 분압이 평형상태가 유지되도록 하였다. Organ chamber내 pericardial space에는 ^3H -inulin이 포함된 관류액으로 채워져 있으며 내경 1mm의 silicone관을 organ chamber의 벽을 따라 4~9회 감은 후 CO_2 와 O_2 의 혼합 가스를 통과시켜 pericardial space 완충액을 pH 7.3~7.4로 유지시켰다. Organ chamber의 silicone관이 gas의 유입으로 인하여 pericardial space에 기포의 발생을 막기 위하여 silicone관을 5%의 BSA로 coating하여 사용하였다. 관류액의 pH 및 가스분압은 Corning 175 Automatic pH/Blood Gas System-(Corning Medical and Scientific, Medfield MA, USA)으로 계속 측정하였다. 심방내압의 변화는 압력 변환기(Statham P23Db, Oxnard, CA, USA)를 거쳐 physiograph(MK-IV, Narco Bio System, Houston, TX, USA)에 기록하였다(Fig 1).

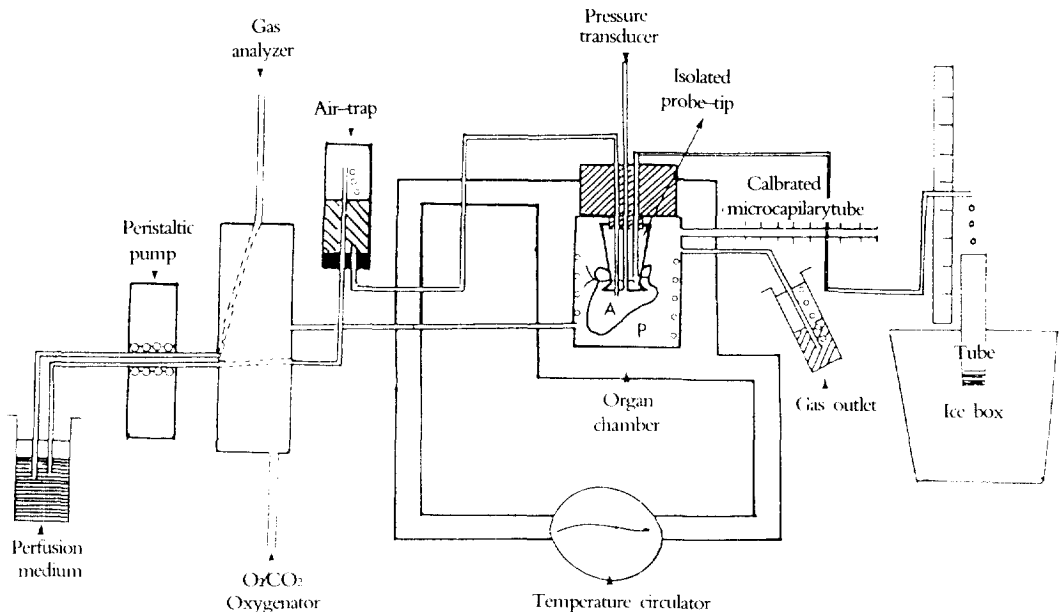


Fig 1. Schematic diagram the components of the perfusion system. Cannulated atrial were perfused with buffer gassed with O_2/CO_2 mixture at a rate of 0.45ml/2min. Small circles in organ chamber indicate the silicone coil for oxygenation of pericardial space. A, atrial lumen; P, pericardial space.

장치된 심방은 약 30분동안 관류하여 ANP의 분비가 일정하게 되도록 하며 이때는 심방이 확장되지 않도록 관류액 수출관의 높이를 심방보다 5cm 아래에 위치하도록 조절하였다. 8분 간격으로 일정한 압력(4cm H₂O)를 주어 심방을 확장시키고 2분 후에 축소시켰다. 2분 간격으로 4회 분획하고 2분동안 압력을 주어 심방을 확장시키며 다시 압력을 제거하여 심방이 원래의 상태로 축소하게 하였다. 심방을 통한 관류액은 얼음물속에 담겨져 있는 시험관에 모았다. 8분마다 이와같은 방법으로 동일 압력(4cm H₂O)을 가하면서 관류액을 분획하였다. 심방의 확장 후 축소시 용적변화의 측정은 pericardial space와 연결된 눈금이 있는 microcapillary tube내 용액의 길이 변화로 하였다. 2분동안에 분비된 ANP의 양은 그 농도와 관류액의 용적을 곱하여 ng ANP/2min/g wet wt로 표현하였다. 실험이 끝난 후 조직의 wet weight를 측정하였으며, 관류액내의 ANP 농도는 실험당일에 측정하였다. 실험조건의 차이에서 오는 오차를 줄이기 위해 매번 대조군과 처리군을 동시에 실험하고 또한 실험장치에서 오는 오차를 줄이기 위하여 매번 organ chamber를 바꾸어 사용하였다.

심방의 용적변화 : organ chamber의 pericardial space에 내경 1mm의 눈금이 있는 microcapillary tube를 연결하였다. Pericardial space는 관류하지 않고 영양액으로 채워져 있으며 오직 microcapillary tube를 통하여서만 열려 있으므로 심방내 용적의 변동은 pericardial space 용적을 변동시키고 그 변동정도는 눈금이 있는 microcapillary tube 상에서의 변화로 나타날 것이다. Hamilton syringe를 이용하여 알고 있는 양의 영양액을 심방내로 주입하거나 확장 후 축소해서 나오는 관류액의 무게를 달아 그때 microcapillary tube 상의 용적변화량과 비교하여 측정의 정확도를 점검하였다.

심방이노호르몬(ANP)의 방사면역측정법 : ANP 농도의 측정은 앞서 발표한 Cho 등²⁷⁾은 방법에 의하여 측정하였다. ANP 항체의 제조는 atriopeptin III(AP III)를 항원으로 사용하며, carbodiimide 방법에 따라 AP III를 thyroglobulin과 conjugation시켜 동량의 Freund's adjuvant와 잘 섞어 2kb 내외의 New Zealand White 토끼에 1주일 간격으로 6주간 여러 부위에 주사하였다. 채혈은 2주 후부터 행하여 그 역가를 측정하며, 혈장은 56°C 30분동안 inactivation시켜 사용하였다. AP III의 항형질은 사용에 편리하도록 소량으로 나누어 -70°C에 보관하였다.

¹²⁵I AP III의 iodination은 chloramine-T 방법에 의하였다. 즉, sodium phosphate buffer(pH 7.4, 0.5M) 25 μ l가 들어있는 Eppendorf tube에 5 μ l의 AP III

(Peninsula Laboratories) 5 μ g/5 μ l와 sodium iodide-125(1mCi/10 μ l, Amersham) 10 μ l를 가하였다. 여기에 iodination하기 직전에 만든 chlormine-T(1mg/ml) 10 μ l를 가한 후 실온에서 40초간 조심스럽게 혼합하고 30% BSA 200 μ l를 넣어 반응을 정지시킨 후 sephadex G-25 column에 조심스럽게 가지고 0.1N acetic acid를 사용하여 0.5ml/min의 속도로 용출하였다. 용출용액은 0.3% BSA, 0.3% lysozyme 과 0.1% glycine을 포함한 0.1% acetic acid를 사용하였으며, 분획을 위한 시험관에는 200KIU/ml의 aptrotinin이 함유된 용출용액 3ml를 가해, 높은 radioactivity에 의한 AP III의 파괴를 방지하였다. 약 0.7ml씩 분획한 직후 잘 혼합하여 25 μ l 속에 들어있는 각 분획의 radioactivity를 측정후 iodinated AP III의 peak에 해당하는 분획을 택하여 tube당 3,000,000cpm이 되도록 분주하여 -70°C에 보관하며 사용할 때 HPLC로 재분리하여 한 시험관에 10,000cpm이 되도록 하여 사용하였다.

심방내 ANP 농도의 측정은 Cho 등²⁷⁾에 의하여 앞서 발표한 방법에 의하였다. AP III의 방사면역측정법은 0.2% neomycin, 10⁻³M EDTA, 50BAEE/ml SBT1, 0.02% sodium axide 및 1% BSA를 포함한 0.1M tri-acetate buffer(pH 7.4)를 사용하였다. 관류액내 ANP는 추출과정을 거치지 않고 직접 측정하였으며, 시료의 양은 100 μ l이었고, 전체용적은 300 μ l로 하였다. 통상적인 ANP 측정방법은 equilibrium assay에 의하나, 경우에 따라 disequilibrium assay도 사용하는 바, 이때는 100 μ l의 antiserum과 시료 100 μ l를 4°C에서 24시간 incubation한 후 ¹²⁵I-APIII를 동량 첨가한 후 24시간 후에 bound form과 free form을 분리하였다. Bound form과 free form의 분리는 charcoal suspension을 사용하여 분리한 다음, γ -counter(Packard, USA)로 측정하였다. ANP의 방사면역측정시 항체의 binding efficiency는 27~31%였으며, non-specific binding은 3%이하였다. Intra assay 및 inter-assay coefficient의 변동은 모두 5%이하였다.

세포외액 이동량의 측정 : 적출심방 관류모형의 pericardial space에 표식자인 5,000(Da)인 ³H-inulin을 방치하여 심방의 기계적인 자극에 의한 심방내 inulin의 이동을 측정하였다. Cocktail solution 5ml에 관류액 100 μ l를 첨가하여 liquid scintillation counter(Tri-Carb 300 C, Packard)로 측정하였다. 이때 cocktail solution의 제조는 dioxane 880ml, methanol 100ml, ethylene glycol 20ml, naphthalene 60g, PPO 16g, POPOP 200mg을 사용하였다. ECF 이동의 측정은 심방의 pericardial space로 부터 심방내로 이동되는 양을 측정하는 바 세포외액의 측정용 표식자인

^3H -inulin을 사용하여 liquid scintillation counter로 측정하였다. 이 결과로 clearance를 정량화 하였다.

Clearance는 다음의 공식에 의하여 산정하였다.

$$\text{ECF translocated from pericardial to atrial space in } \mu\text{l}/2\text{min}/\text{g} = \frac{\text{total radioactivity in perfusate in cpm}/2\text{min}}{\text{radioactivity in pericardial reservoir in cpm}/\mu\text{l}} \times 1,000/\text{atrial weight}(\text{mg})$$

ECF 이동량으로 보정한 ANP의 농도는 아래와 같이 산출하였다.

$$\text{ANP concentration}(\mu\text{M}) = \frac{\text{ANP pg}/2\text{min}/\text{g}}{\text{ECF translocated in } \mu\text{l}/2\text{min}/\text{g}} / 3060$$

(여기에서 3060은 ANP 1~28의 molecular weight 이다)

통계적 처리: 실험결과와 통계적 처리는 Student's t-test로 하였으며, P-value $p < 0.05$ 인 것을 통계적 유의차가 인정되는 것으로 간주하였다. 실험결과와 표현은 mean \pm SE로 하였다.

결 과

관류액내 ANP의 방사면역측정법: 심방 관류액내 미량으로 분비된 ANP의 측정은 방사면역측정법에

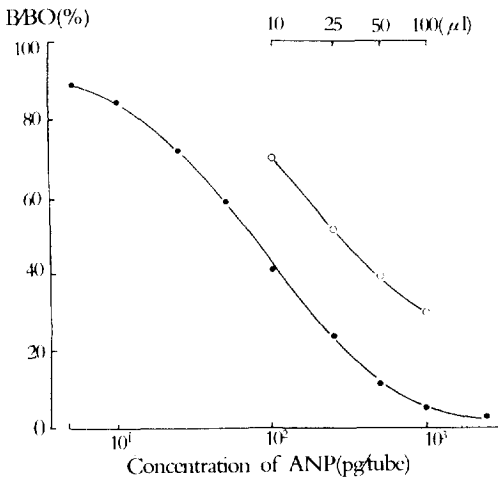


Fig 2. Standard curve and serial dilution curve of atrial perfusate BBO(%), competitive bound amount of antigen and ^{125}I -antigen/ ^{125}I -antigen and antibody bound amount $\times 100$: •, Atriopeptin III; ○, Atrial perfusate.

따랐다. 방사면역측정법에서의 항원-항체결합체(bound form)와 비결합체(free form)의 분리에는 dextran-coated charcoal 방법을 사용하였다. 동위원소로 표지된 항원만이 항체와 결합된 양(B_0)을 100으로 하고, 항체에 방사선 동위원소가 표지된 항원과 표지 안된 항원의 경쟁적인 결합(B)을 비율(B/B_0)로 나타내어 표준농도와 비교하고 정량화 하였다. 심방 관류액의 희석정도에 따라 관류액내 ANP는 atriopeptin III의 표준용액곡선과 평행함을 보여주었다(Fig 2).

심방내압의 기계적 자극에 의한 심방 용적변동과 이에 따른 ANP 분비, ECF 이동의 변동: 적출심방 관류모형을 이용한 심방으로 부터의 ANP 분비는 심방의 기계적인 확장 후 축소에 의하여 즉, 랫드의 좌심방내에 4cm H₂O의 압력을 반복하여 가하였을 때 ANP 증가, ECF 이동량의 반복적 재현이 실현됨

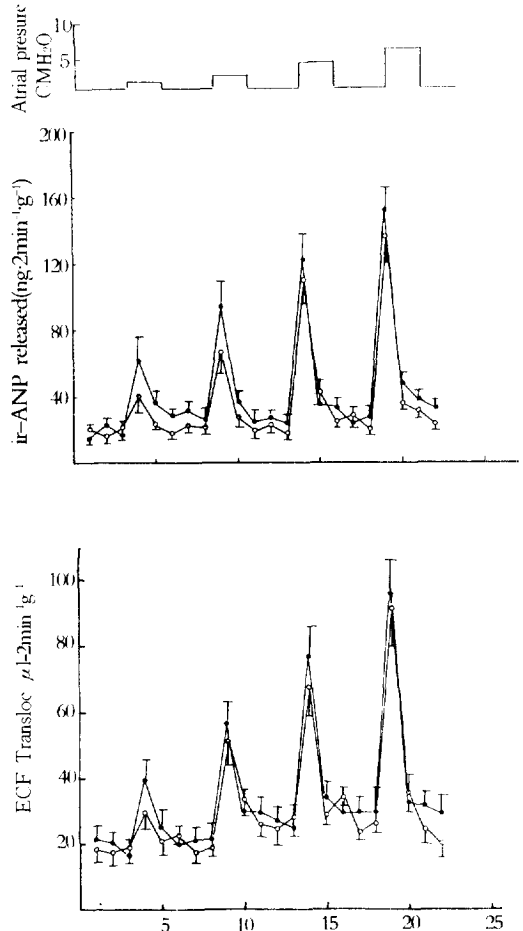


Fig 3. Effect of Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(RB), control buffer on ANP secretion(A), ECF translocation(B).

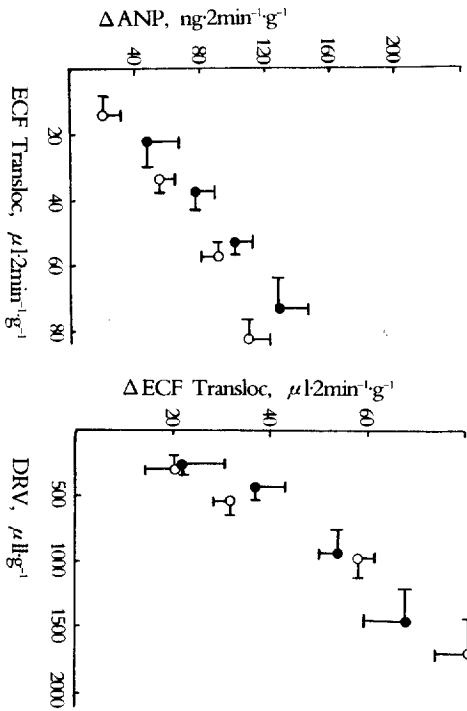


Fig 4. Effect of control buffer on Δ ANP secretion(A), Δ ECF translocation(B) in response to pressure change.

을 확인할 수 있었으며, 이러한 변화는 대조군이나 처리군에서 심방이 확장 후 축소함에 따라 ANP의 분비와 ECF 이동량이 일치하게 증가됨을 관찰할 수 있었다. 좌심방이 확장되지 않은 대조군에서의 Basal 값은 ANP 분비량이 $8.20 \pm 2.45 \text{ ng}/2\text{ min}/\text{g}$ 이었으며, 이때의 ECF 이동량은 $0.24 \pm 0.03 \mu\text{ l}/2\text{ min}/\text{g}$ 이었다(Fig 3, 4).

기계적 자극에 의한 심방 ANP 분비에 미치는 superoxide anion의 효과: 심방으로 부터의 ANP 분비는 심방의 기계적인 확장 후 축소에 의하여 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었으며, 랫드의 좌심방 내 압을 4cm H₂O로 반복하여 압력을 가하였을 때 $5 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$ 를 가한 처리군에서도 ANP 분비와 ECF 이동량의 변동이 반복적으로 재현됨을 관찰할 수 있었다. ANP의 분비에 있어서는 대조군에 비하여 처리군에서 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었으며 이에 따른 ECF 이동량은 대조군과 처리군간의 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig 3, 4). 심장에 4cmH₂O의 압력으로 인한 심장의 확장 후 축소의 용적변화는 대조군이 $6.81 \pm 0.72 \mu\text{ l}$, 처리군이 $5.37 \pm 0.47 \mu\text{ l}$ 로써 처리군은 대조군에 비하여 억제되는 양상을 보였

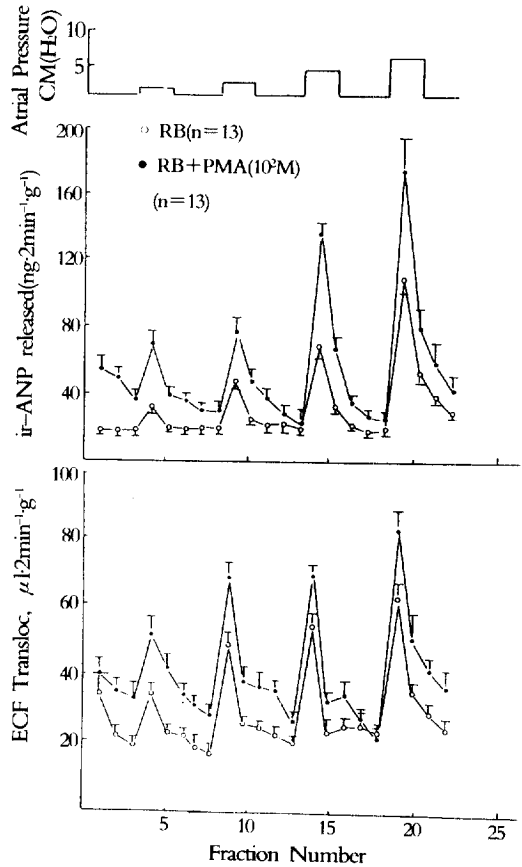


Fig 5-A. Effect of RB+PMA, 10^{-4} M , on Δ ANP secretion(A), Δ ECF translocation(B) and ANP concentration(C) in the isolated perfused rat atria.

지만 유의성을 인정할 수 없었다(Fig 5C).

좌심방에 4cmH₂O의 압력에 의한 Δ ANP 분비는 대조군이 $15.19 \pm 0.98 \text{ ng}/2\text{ min}/\text{g}$, 처리군이 $23.20 \pm 3.04 \text{ mg}/2\text{ min}/\text{g}$ 으로서 처리군이 유의성($p < 0.05$)있는 증가를 확인할 수 있었으며(Fig 5A), Δ ANP 농도 역시 대조군 $17.73 \pm 4.57 \mu\text{ M}$, 처리군 $45.18 \pm 8.24 \mu\text{ M}$ 로서 처리군이 현저하게($p < 0.01$) 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig 5B). 심방의 확장 후 축소용적 변화에 따른 Δ ECF 이동량은 대조군이 $0.298 \pm 0.07 \text{ mg}/2\text{ min}/\text{g} \cdot \mu\text{ l}_{\text{DRV}}$, 처리군이 $0.123 \pm 0.025 \text{ ng}/2\text{ min}/\text{g} \cdot \mu\text{ l}_{\text{DRV}}$ 으로써 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있는 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig 5D).

따라서 심방에 4cmH₂O 압력 즉, 기계적인 압력을 가한 상태에서 $5 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$ 의 ANP 유리조절 효과는 심방의 유리기전에 의하여 증가됨을 관찰할 수 있었다.

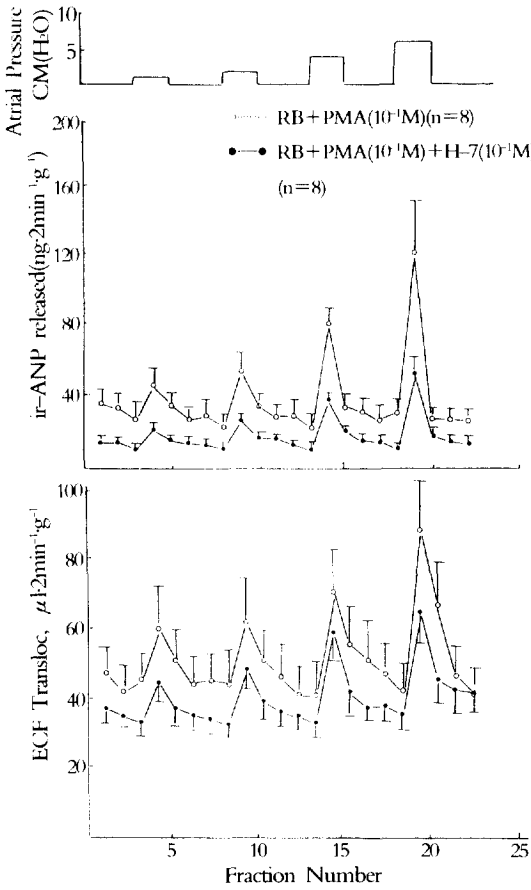


Fig 5-B. Effect of RB+PMA+H-7, 10^4 M, on Δ ANP secretion(A), Δ ECF translocation(B) and ANP concentration(C) in the isolated perfused rat atria.

고찰

심방으로 부터 분비되는 혈관을 이완시키고 이뇨 및 Na^+ 배설 그리고 모세관 투과성을 증가시켜 혈관 내 혈장의 물을 세포외액으로 이동시키는 작용 등이 있는 ANP의 분비기전에 관한 일반적인 이론은 아직 정립되어 있지 않은 실정이다 자율신경계 및 자율신경계 약물에 의한 ANP 분비조절이 보고되어져 있으나 그 견해는 아직 일치하지 않고 있으며, 더우기 많은 종류의 호르몬 분비조절에 있어서 가장 중요한 세포내 second messenger인 cAMP, Ca^{++} , IP₃, Diacylglycerol 등^{28,29,31}의 역할이 아직 명확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다. 또한 많은 종류의 호르몬 분비자극제에 의한 ANP 분비촉진에 대한 대부분의

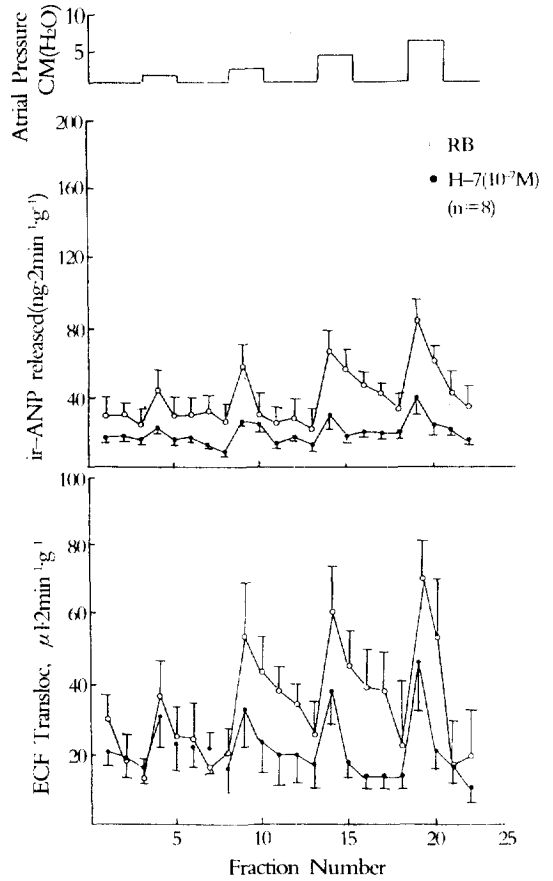


Fig 5-C. Effect of H-7, 10^7 M, on ANP secretion(A), ECF translocation(B) and ANP concentration(C) in the isolated perfused rat atria.

실험이 심방조직 또는 심방근 세포의 기계적인 일의 향진을 동반한다고 생각할 때에 그 기전의 규명은 쉽지 않았다. Cho 등^{15,26,27}의 ANP 분비기전에 대한 연구에 의하면 ANP 분비는 심방의 확장과 축소에 의하여 증가하며 즉, 심방의 확장 후 축소 때에 나타나고, ANP의 분비증가는 심방의 확장 후 축소시 용적변화^{28,29}와 용적변화의 빈도 즉, 전기자극빈도에 의존적임¹⁵이 이미 밝혀져 있다. 또한 심장벽의 심장근을 통한 물질의 이동 기전이 존재하며, 심방의 ANP 분비에는 심방의 기계적인 축소과정이 필수적임이 주장되었다^{15,30}. 이러한 결과와 현상으로 부터 Cho 등의 ANP 분비조절 기전으로는 “sequential mechanism”이 제시²⁷되었다. 이 이론에 의하면 ANP 분비의 증가 또는 감소는 두단계에서의 조절이 가능한 바 ANP의 심방근 세포의 세포외액으로 부터의

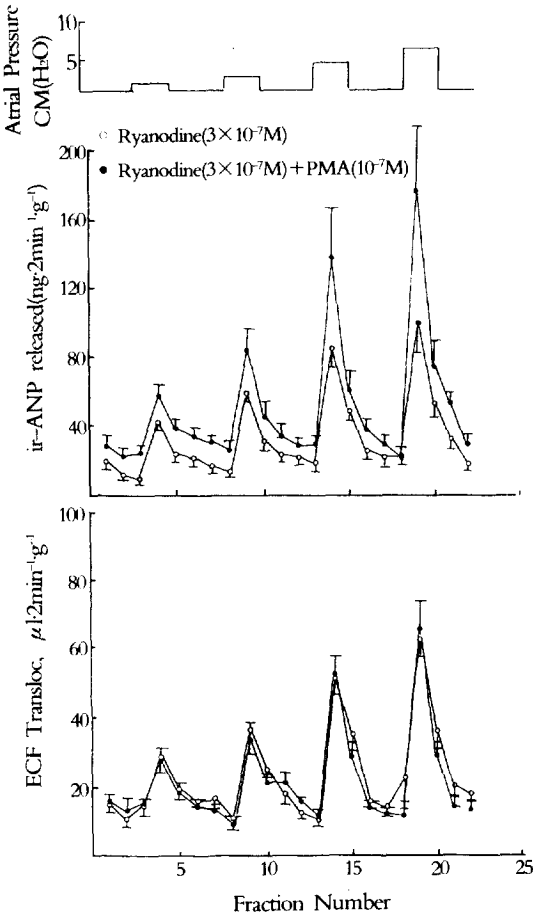


Fig 5-D. Effect of Ryanodine+PMA, $10^{-7}M$, on ANP secretion(A), ECF translocation(B) and ANP concentration(C) in the isolated perfused rat atria.

유리단계와 유리된 ANP를 포함한 심방근 세포외액의 심방강내로 이동되는 즉, 세포외액이 이동 즉, 분비의 단계라고 할 수 있다. 이 두단계중 어떤 조절요인이 ANP의 유리단계를 억제하거나 세포외액의 이동량을 억제하면, ANP의 심방강내로의 분비는 감소하며, ANP 유리의 단계를 강화하거나 세포외액의 이동량을 증가시키면, 이는 ANP의 분비의 증가를 일으킬 것이다.

따라서 심방근의 ANP 분비조절에 있어서 superoxide anion의 효과를 관찰하기 위하여 실험한 결과, $5 \times 10^{-4}M$ H_2O_2 를 가한 처리군에서 현저한 ANP의 분비증가 효과를 관찰할 수 있었다. 이는 생리적 세포조절로서 H_2O_2 가 myocardial phospholipase D에 영향을 미치므로써 심방근 세포내의 Ca^{++} 의 변동을 야기시킨다고 보고^{25,26}와 sarcolemma에서 전기의존

적인 Ca^{++} channel^{27,28}, $Na^+ - Ca^{++}$ 교환기²⁹ Ca^{++} pump^{33,37}를 억제시킨다고 알려져 있다. 또한 ANP 농도의 변동 역시 심방근 세포내외의 Ca^{++} 변동에 의하여 이루어진다는 Cho 등⁴의 보고가 있었다. 그러나 본 연구자는 다른 연구자들이 사용하였던 모형과 다른 non-beating 심방관류 모형을 사용하여서 ANP 분비조절 기전을 밝히기 위하여 노력하였으며, 기계적인 심방의 자극효과를 가함과 동시에 약물의 효과를 함께 확인한 결과, 심방의 기계적인 자극에 따른 ANP 분비가 $5 \times 10^{-4}M$ H_2O_2 에서 대조군에 비하여 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었고, 분비조절기관은 심방의 분비기준 보다는 유리기전을 통하여 분비증가됨을 확인할 수 있었다.

결론

심방근 세포는 혈장 내분기계중 atrial natriuretic peptide(ANP) 합성의 가장 중요한 장소이다. ANP는 여러 요인에 의하여 조절되고 있으나 그 조절기전 및 ANP의 분비와 관련된 세포내 신호전달체계에 관하여서는 아직 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 심방근 세포의 기계적 자극에 의한 ANP 분비기전에 H_2O_2 가 어떠한 역할을 하고 있는지를 구명하고자 랫드의 적출심방 관류모형을 통하여 ANP 분비반응에 미치는 H_2O_2 의 영향을 밝힌 것이다.

1. AP III를 항원으로 사용하여 적출 심방관류액의 농도분석이 가능하였으며, 표준곡선과 관류액의 dilution curve가 평행하게 나타남을 관찰하였다.

2. 적출심방 관류모형의 심방내압을 $4cmH_2O$ 로 증가시킬 경우 대조군과 $5 \times 10^{-4}M$ H_2O_2 를 처리한 처리군이 모두 반복적으로 재현됨을 확인할 수 있었다.

3. ANP 분비의 증가는 대조군에 비하여 처리군에서 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었으며, ECF 이동량은 유의성 있는 증가를 확인할 수 없었다.

4. ΔANP 분비증가와 ΔANP 농도의 증가는 대조군에 비하여 처리군에서 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었다.

5. 심방의 확장 후 축소용적변화는 대조군보다 처리군이 억제되는 양상을 보였지만 유의성 있는 억제 효과를 관찰할 수 없었다.

이상의 결과는 좌심방의 기계적 자극에 의하여 ANP 유리와 분비기전에 H_2O_2 가 관련되어 있고, 이중에서 특히 ANP의 유리기전에 관련되어 있음을 추측할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Cir Res* 1956; 4: 85~90.
2. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956; 14: 99~112.
3. Jamieson JD, Palade GE. Specific granules in atrial muscle. *J Cell Bio* 1964; 23: 151~172.
4. Marie JP, Guillerot H, Hatt PJ. Le degre de granulation des cardiocyte auricularis: Etude planimetrique an cours de defferents apports de cauet de sodium chezle rat. *Pathol Biol* 1979; 24: 549~554.
5. De Bold AJ. Heart atria granularity effects of changes in water lelectrolyte balane. *Proc Soc Exp Biol Mel* 1959, 161: 508~511.
6. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial nyocardial extract in rat. *Cir Res* 1981; 28: 89~94.
7. Gutkowska J, Neumer M. Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extracardiac tissues. *Endocrine Rev* 1989; 10: 519~536.
8. Kim SH, Cho KW, Seul KH, et al. Presence of immunoreactive atrial natriuretic in follicular fluid, overy and ovarian perfusates. *Life Sci* 1989; 45: 1581~1589.
9. De Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the hrcar. *Science* 1985; 230: 767~769.
10. Forsmann WG, Cardiac hormones. Reviews on the morphology, biochemistry, and molecular biology of the endocrine heart. *Euro J Clin Invest* 1986; 16: 439~651.
11. Dietz JR. Release of natriuretic factor from rat heart-lung preparation by atrial distention. *Am J Physiol* 1984; 247: R1093~R1096.
12. Ruskoaho H, Lang RE. Increase in atrial pressure releases atrial natriuretic peptide from isolated perfused rat hearts. *Pflugers Arch* 1986; 407:170~174.
13. Katsube N, Schwartz D, Neddle man P. Realse of atriopeptin in the rat by vasoconstrictor or water immersion correlates with changes in atrial pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 937~944.
14. Lang RE, Tholken H, Ganten D, et al. Atrial natriuretic factor-a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985; 314: 264~266.
15. Cho KW, Seul KH, Kim SH. et al. Atrial pressure , distension and pacing frequency in ANP secretion in isolated perfused rabbits atria. *Am J Physiol* 1991.
16. Doubell AF. The second messenger systgem mediating the secretion of Atrial Natriuretic Peptide from the isolated rat heart during rapid cardiac pacing. *Life Sciences* 1989; 45: 2193~2200.
17. Erne P, Raine AEG, Burgisser E, et al. Paradoxical inhibition of atrial natriuretic peptide during pacing-induced hypotension. *Clin Sci* 1987; 73: 459~462.
18. Geer PG, Wang BC, Flora-Ginter G, et al. Effect of hemorrhage on plasma atriopeptin levels in conscious dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187: 327~334.
19. Marie A, Bogoyevitch P, parker J, et al. Characterization of PKC isotype expression in adult rat heart. *Cir Res* 1993; 72: 757~767.
20. Yamnji T, Ishibashi M, Nakaoka H, et al. Possible role for atrial natriuretic peptide in polyuria associated with proximal atrial arrhythmia. *Lancet* 1985; 1: 1211.
21. Ziegler MG, Shackford SR, Wilner KD, et al. Atrial natriuretic factor in hypovolemic tachycardia. *Experientia* 1987; 43: 1021~1022.
22. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, et al. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Cir Res* 1988; 62: 191~195.
23. Koller PT, Grekin RT, Nicklas JM. Paradoxical response of plasma atrial natriuretic hormone to pericardiocentesis in cardiac tamponade. *Am J Cardiol* 1987; 59: 491~492.
24. Walsh KP, Williamns TDM, Wilder R, et al. Decline of atrial natriuretic peptide release in dogs during sustained rapid cardiac pacing. *Clin Sci* 1988; 74: 567~570.
25. Cho KW, Seul KH, Ryu H, et al. Characteristics of distension-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *Regul Peptides* 1988; 22: 333~345.
26. Cho KW, Seul Kh, Kim SH, et al. Redution volume dependence of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated rabbit atria. *J Hypertions* 1989; 7: 371~375.
27. Cho KW, Seul KH, Kim SH, et al. Sequential mechanism of atrial natriuretic peptide secretion in isolated perfused rabbit atria. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 423~431.
28. Capogrossi MC, Kaku T, Filburn C, et al. Phorbol ester and diacylglycerol stimulate membrane associa-

- tion of PKC and have a negative inotropic effect mediated by changes in cytosolic Ca^{2+} in adult rat cardiac myocytes. *Cir Res* 1990; 62: 347~357.
29. Farago A, Nishizuka Y. Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS* 1990; 268: 350~354.
 30. Nishikawa M, Yasuhiro U, Hidaka M, et al. H-7, a potent inhibitor of PKC, inhibits the differentiation of HL-60 cells induced by phorbol diester. *Life Science* 1986; 39: 1101~1107.
 31. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661~665.
 32. Jian D, Johanna TA, Meij RP, et al. Depression of cardiac sarcolemmal phospholipase D activity by oxidant-induced thiol modification. *Cir Res* 1992; 71: 970~977.
 33. Xie Z, Wang Y, Askari A, et al. Studies on the specificity of oxygen metabolites on the cardiac sodium pump. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 911~920.
 34. Seul KH, Cho YW, Kim SH. Right atrial predominance of atrial natriuretic peptide rat atrial. *Regul peptides* 1992; 39: 67~81.
 35. Eley DW, Koreckly B, Fliss H, et al. Calcium homeostasis in rabbit ventricular myocytes: Disruption by hypochlorous acid and restoration by dithiothreitol. *Cir Res* 1991; 69: 1132~1138.
 36. Kanek M, Panagia V, Paolillo G, et al. Inhibition of cardiac phosphatidyl-ethanolamine N-methylation by oxygen free radicals. *Acta Biochem Biophys* 1990; 1021: 33~38.
 37. Kaneko M, Beamish RE, Dhalla NS. Depression of heart sarcolemmal Ca^{++} -pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1989; 21: H368~H374.
 38. Kaneko M, Lee SL, Wolf CM, et al. Reduction of calcium channel antagonist binding by oxygen free radicals in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21: 935~943.
 39. Burton K, Morris AC, Massey KD, et al. Free radicals alter ionic calcium levels and membrane PLs in cultured rat ventricular myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 22: 1035~1047.
 40. Cho KW, Kim SH, Seul KH, et al. Effect of extracellular calcium depletion on the two-step ANP secretion in perfused rabbit atria. *Regul Peptide* 1994; 52: 129~137.