

적출관류 토끼 심장에서 칼슘 전처치에 의한 심근보호 효과와 Protein Kinase C와의 관계

김 용 한* · 손 동 섭* · 조 대 윤* · 양 기 민* · 김 호 덕**

=Abstract=

Cardioprotective Effect of Calcium Preconditioning and Its Relation to Protein Kinase C in Isolated Perfused Rabbit Heart

Yong Han Kim, M.D.*, Dong Suep Sohn, M.D.*, Dae Yoon Cho, M.D.*,
Ki Min Yang, M.D.*, Ho Dirk Kim, M.D.**

Background: It has been documented that brief repetitive periods of ischemia and reperfusion (ischemic preconditioning, IP) enhances the recovery of post-ischemic contractile function and reduces infarct size after a longer period of ischemia. Many mechanisms have been proposed to explain this process. Recent studies have suggested that transient increase in the intracellular calcium may have triggered the activation of protein kinase C(PKC); however, there are still many controversies. Accordingly, the author performed the present study to test the hypothesis that preconditioning with high concentration of calcium before sustained subsequent ischemia(calcium preconditioning) mimics IP by PKC activation. **Material and Method:** The isolated hearts from the New Zealand White rabbits(1.5~2.0 kg body weight) were perfused with Tyrode solution by Langendorff technique. After stabilization of baseline hemodynamics, the hearts were subjected to 45-minute global ischemia followed by a 120-minute reperfusion with IP(IP group, n=13) or without IP(ischemic control, n=10). IP was induced by single episode of 5-minute global ischemia and 10-minute reperfusion. In the Ca²⁺ preconditioned group, perfusate containing 10(n=10) or 20 mM(n=11) CaCl₂ was perfused for 10 minutes after 5-minute ischemia followed by a 45-minute global ischemia and a 120-minute reperfusion. Baseline PKC was measured after 50-minute perfusion without any treatment(n=5). Left ventricular function including developed pressure(LVDP), dP/dt, heart rate, left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP) and coronary flow(CF) was measured. Myocardial cytosolic and membrane PKC activities were measured by ³²P- γ -ATP incorporation into PKC-specific peptide. The infarct size was determined using the TTC (tetrazolium salt) staining and planimetry. Data were analyzed using one-way analysis of variance(ANOVA)

*중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실

Departments of Chest Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University

**중앙대학교 의과대학 조직학교실

Departments of Histology, College of Medicine, Chung-Ang University

논문접수일 : 98년 12월 30일 심사통과일 : 99년 4월 10일

책임저자 : 손동섭, (140-757) 서울특별시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대학교 의과대학 흉부외과. (Tel) 02-748-9566, (Fax) 02-794-4319
본 논문의 저작권 및 전자매체는 대한흉부외과학회에 있다.

variance(ANOVA) and Tukey's post-hoc test. **Result:** IP increased the functional recovery including LVDP, dP/dt and CF(p<0.05) and lowered the ascending range of LVEDP(p<0.05); it also reduced the infarct size from 38% to 20%(p<0.05). In both of the Ca²⁺ preconditioned group, functional recovery was not significantly different in comparison with the ischemic control, however, the infarct size was reduced to 19~23%(p<0.05). In comparison with the baseline(7.31±0.31 nmol/g tissue), the activities of the cytosolic PKC tended to decrease in both the IP and Ca²⁺ preconditioned groups, particularly in the 10 mM Ca²⁺ preconditioned group(4.19±0.39 nmol/g tissue, p<0.01); the activity of membrane PKC was significantly increased in both IP and 10 mM Ca²⁺ preconditioned group (p<0.05; 1.84±0.21, 4.00±0.14, and 4.02±0.70 nmol/g tissue in the baseline, IP, and 10 mM Ca²⁺ preconditioned group, respectively). However, the activity of both PKC fractions were not significantly different between the baseline and the ischemic control. **Conclusion:** These results indicate that in isolated Langendorff-perfused rabbit heart model, calcium preconditioning with high concentration of calcium does not improve post-ischemic functional recovery. However, it does have an effect of limiting(reducing) the infarct size by ischemic preconditioning, and this cardioprotective effect, at least in part, may have resulted from the activation of PKC by calcium which acts as a messenger(or trigger) to activate membrane PKC.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1999;32:603-12)

Key word : 1. Rerfusion
2. Calcium
3. Myocardial protection

서 론

1980년대 중반 이후 10년 동안 허혈에 대한 심장의 반응에 관한 지식은 경이적인 변화를 이룩하여왔음은 주지의 사실이나 1980년대 중반까지만 하더라도 가역적인 허혈 손상을 입은 심근세포는 후속되는 허혈이 있을 때 비가역적인 손상을 받기 쉬운 것으로 치부되었으^{1,2)} 많은 연구자들은 15분 동안의 허혈로 손상된 심근조직은 재관류를 하더라도 수 시간 동안 거의 사망에 가까운 상태에 놓이게 된다고 믿었다. 그러나 Murry 등³⁾은 허혈발생후 5분 이내에 혈류를 재건한 실험에서 후속된 보다 긴 기간의 허혈에도 불구하고 심근세포는 역설적으로 허혈에 대하여 저항성이 있음을 발견하고 이와 같이 짧은 기간 동안의 허혈-재관류의 반복으로 나타나는 심근보호 효과를 'ischemic preconditioning'(허혈성 전처치, 이하 IP로 약함)이라고 명명하였다. 그들은 IP라는 것은 허혈에 의하여 유도되고 그 반응은 비교적 신속하게 일어나며 실제로는 심근세포 괴사 범위의 한정 등으로 나타남을 관찰하였다. 이후 잠종개, 돼지, 토끼, 흰쥐 등에서 실험적으로 IP에 의한 심근보호 효과는 증명되고 있다⁴⁻⁸⁾. 이상과 같이 IP에 의하여 나타나는 심근보호 효과는 약물투여 등으로 나타나는 것과는 달리 심근세포에 내재하는 자기보호 기전에 의하여 나타나는 것으로 추측되고 있는데, 이에 대한 기전을 밝힘으로써 간헐적으로 발생하는 허혈로부터 심근경색으로

이행되기까지의 세포생물학적인 전개과정이나 이의 발생기전을 이해하며, 허혈성 심장병의 치료나 개심술후 심장기능 회복 증진 등을 위한 방법을 모색할 수 있다.

칼슘 이온은 세포표면에서 발생하는 신호를 세포소기관이나 세포내 단백질로 전달해주는 중요한 매개물질중의 하나이며, 단세포로 구성되어 있는 유기체의 운동, 세포내 유동(cytoplasmic streaming), 섬모나 편모의 운동 등을 유도하거나, 운동성이 없는 세포에서도 자극분비연결(stimulus-secretion coupling)을 도모하는 것으로 알려져 있다. 심근세포에서 세포막의 탈분극으로 수축기구를 이루는 단백질들의 상호작용이 일어나면 심장벽에서 장력발생과 단축(shortening)이 일어난다. 이러한 과정에서 칼슘 이온은 심근세포의 흥분수축연결(excitation-contraction coupling)을 매개하는 중요한 역할을 한다. 이와 같이 칼슘 이온은 세포 운동에 없어서는 안되는 중요한 인자인 것은 틀림없으나 세포내 칼슘 증가로 초래되는 칼슘과부하는 허혈 심근세포 손상의 한 원인이 밝혀져 있다^{9,10)}. 그러나 Ashraf 등¹¹⁾은 적출 관류 흰쥐 심장에서 칼슘결핍 용액과 고농도의 칼슘을 포함한 용액을 교대로 반복하여 투여하면 후속되는 장시간 동안의 허혈후 재관류시 심근기능 회복이 증가되는 등의 IP와 같은 심근보호 효과가 나타남을 관찰하였다. 그러나 현재까지의 여러 연구 결과로 볼 때, 허혈-재관류를 연속적으로 실시하여 IP를 유도할 경우 IP 유도방법 자체에 의하여 미세구조적 변화는 나타나지 않

나 심근기능 저하가 지속되는 이른바 심근기질(myocardial stunning) 현상을 일으켜 재관류시 심장기능을 약화시킬 가능성이 있기 때문에 논란의 여지가 있다.

이상으로 연구자는 장시간 동안의 허혈전에 높은 농도의 칼슘을 투여할 경우 첫째, 심근기능 회복 증가나 심근괴사 범위 한정 등의 IP와 같은 심근보호 효과가 나타나는가를 알아보고, 둘째, 심근보호 효과가 나타난다면 그 발생기전이 최근에 논의되고 있는 protein kinase C(PKC)의 활성화와 어떤 관계에 있는가를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 재료

일정한 환경 아래에서 물과 복합사료를 무제한으로 주어 사육한 New Zealand White종 토끼(체중 1.5~2.0 kg) 53마리를 암수 구별없이 실험동물로 사용하였다. 실험동물에게는 도살 24시간 전부터는 물만 주었으며 무작위로 선택하여 허혈 대조군(ischemic control group, n=10), IP군(preconditioned group, n=13), 10 및 20 mM 칼슘 전처치군(calcium preconditioned groups, 각각 n=10, n=11)으로 나누어 실험을 실시하였다. PKC활성도 변화를 비교하기 위하여 아무런 처치를 하지않은 기준(baseline, n=5)의 실험군을 추가하였다.

본 실험에서 사용한 화학약품은 PKC assay system (Amersham, USA)를 제외하고는 모두 Sigma Chemical Company(St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물의 처치

모든 실험은 미국 생리학회에서 추천하는 실험동물 사용 지침(Guidelines for the Use of Laboratory Animals, American Physiological Society, 1985)에 따라 실시하였다. Heparin(300 IU/kg)을 복강내 투여하고 30분 경과후 실험동물의 후두부를 강타하여 실신시켜 즉시 흉부를 절개하고 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 미리 냉각시켜둔 생리식염수에 담구어 대동맥에 카눌라를 삽입하고 4-0 견봉합사로 묶은 후 심장관류 장치(Size No.5, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany)에 고정하여 non-recirculating Langendorff방법에 따라 100% 산소로 포화된 Tyrode-용액(containing in mM: NaCl 140, KCl 4.4, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0; pH 7.4)으로 관류하였다. 실험중 심장을 관류액 중에 1/2정도 잠기게 하였으며 관류액의 온도와 심장을 매다는 방(water-jacketed heart chamber)의 온도는 37°C로, 관류압과 관류량은 각각 60 mm Hg, 35 ml/min으로 유지하였다.

3. 실험 원안(protocol)

전체적인 실험 원안은 Fig. 1과 같다. 요약하면 suction electrode를 우심방 외벽에 2~3 mm 간격으로 붙이고 이에 연결된 전기자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)로 1분당 심박동수가 150이 되도록 조정하여 (4V, 0.5 msec interval) Tyrode용액으로 50분 동안 관류하여 심장기능이 일정히 유지되도록 한 후(이 기간을 기준의 혈역학(baseline hemodynamics) 값으로 설정하였다) 실험을 실시하였다. 허혈 대조군에서는 IP없이 45분 동안 관류를 차단하여 전체허혈(global ischemia by no-flow)후 120분 동안 재관류하였으며 IP군에서는 5분 동안의 전체허혈과 10분 동안의 재관류를 1회 실시하여 IP를 유도한 후 대조군에서와 같이 45분 동안 전체허혈후 120분 동안 재관류하였으며, 칼슘 전처치군에서는 5분 동안 전체허혈을 실시하고 CaCl₂ 10 또는 20 mM을 포함한 관류액으로 관류한 후 대조군에서와 같이 45분 동안 전체허혈후 120분 동안 재관류하였다. 기준선에서의 PKC활성도 측정을 위한 실험군에서는 아무런 처치없이 50분 동안 관류만을 실시하였다. PKC활성도 측정을 위한 시료들은 실험종료후 급속냉동하여 측정 때까지 -80°C에 보관하였다.

4. 좌심실기능의 측정

기준선의 혈역학 값이 일정하게 유지되면 카눌라에 연결된 라텍스 고무풍선(size 10, Hugo Sachs Elektronik)을 폐정맥을 통하여 좌심실에 삽입하고 압력전달장치(pressure transducer, Harvard Apparatus)에 연결하였다. 정밀주사기(screw-driven precision syringe)를 이용하여 라텍스 고무풍선에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 8~10 mm Hg가 되도록 조정한 후 기준선 및 재관류 시작후 실험 원안에 따라 좌심실압(left ventricular pressure), 수축력(좌심실압의 미분값, dP/dt), 심박동수 등을 4-channel 열전사 기록기(rectilinear polygraph, Watanabe Graphtech, Tokyo, Japan)에 각각 기록하였다.

5. 관혈류(coronary flow)의 측정

관류를 시작하여 심장기능이 일정히 유지되게한 후 관류액의 누출을 방지하기 위하여 폐정맥과 대정맥을 견봉합사로 묶은 후 폐동맥을 통하여 우심실내로 카눌라를 삽입하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하였다. 실험 원안에 따라 정해진 시점에서 우심실에서 흘러 나오는 관류액을 각각 1분 동안 실험관에 모아 관혈류 측정에 이용하였으며 값은 ml/min으로 표기하였다.

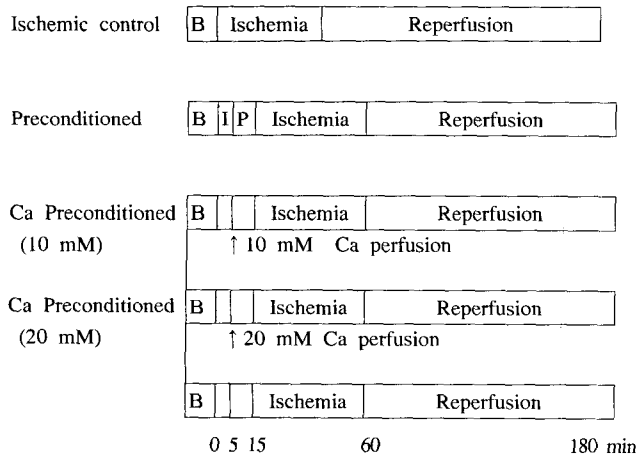


Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. In the calcium preconditioned group, the heart was subjected to perfusion with calcium-free perfusate for 5 min and high concentration calcium(10 or 20 mmol/L) perfusate for 10 min before subsequent sustained ischemic for 45 min.

6. 좌심실의 괴사 크기 측정

각 실험 종료후 심장을 관류장치로부터 분리하여(대조군, n=5; IP군, n=5; 10 및 20 mM 칼슘 전처치군 각각 n=5) 실온에서 1% triphenyltetrazolium chloride(TTC, in phosphate buffer, pH 7.4)에 20분 동안 침적한 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정된 심장을 심저부와 평행하는 방향으로 2 mm 간격으로 횡절단한 후 심저부를 향하는 횡단면을 Kodak Ektachrome 필름(ISO 100)으로 사진촬영하여 괴사부위 측정 에 사용하였다. 환등필름을 영사막에 투사하고 심실중격을 포함하는 좌심실 횡단면(LV cross sectional area, LVA)과 괴사부위의 단면(infarct area, IA)을 추적하여 균질한 무게를 가진 종이위에 복사한 후 구적계(area-curve meter, Ushikata X-plan 360dII, Tokyo, Japan)를 이용하여 괴사부위의 밀도(% IA/LVA)를 구하고 이를 괴사 크기로 간주하였다. 괴사범위의 측정은 훈련된 세 사람이 같은 표본을 3회 이상 측정하여 평균값을 그 표본의 대표값으로 간주하였다.

7. Protein kinase C(PKC) 활성화 측정

PKC활성도는 Takai 등의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 실험 종료후 좌심실(심실중격 포함)을 분리하여 20 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1.0 mM iodoacetic acid, 1.0 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1.0 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1.0 mM EGTA(ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid), 10 mM β -mercaptoethanol(pH 7.4, 4°C)을 함유한 용액을 첨가하여 균질

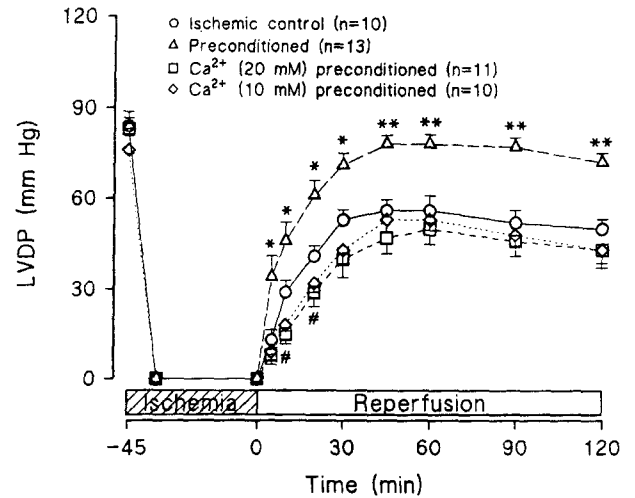


Fig. 2. Changes in the left ventricular developed pressure (LVDP) during ischemia and reperfusion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ischemic control vs preconditioned; # $p < 0.05$, ischemic control vs Ca^{2+} preconditioned.

화한 후(Ultra-Turrax T-25, Germany) 4°C 하에서 100,000 g로 1시간 동안 원심분리하여 상청액을 세포질분획(cytosol fraction)으로 사용하였다. 침전물을 다시 위의 용액에 Triton X-100(0.3 vol%)을 첨가한 용액으로 녹여 4°C 하에서 1시간 동안 교반하고 원심분리하여 상청액을 세포막분획(membrane fraction)으로 사용하였다. 각 분획의 활성화도는 PKC assay system(Amersham RPN77)을 사용하여 측정하였다. 즉, 각각의 시료 10 μ g을 0.2 μ Ci의 ^{32}P - γ -ATP(specific activity, 3,000 Ci/mmol, Amersham)와 함께 15분 동안 반응시킨 후 방사능(radioactivity)을 측정하여 PKC활성도를 측정하였다. 이상의 방법을 각 시료당 3회 실시하여 평균을 취하였으며, 기준선의 PKC활성도는 허혈이나 IP없이 관류시작후 50분 동안 기준선의 혈역학 값이 일정하게 유지되게 하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 측정값은 모두 nmol/g tissue로 표기하였다.

8. 통계처리

모든 통계수치는 평균 \pm 표준오차(SEM)로 표기하였다. 대조군을 포함한 실험군들 사이에서 통계학적인 유의성 유무를 보기 위하여 분산분석을 실시하여 유의성이 있다고 판단되면 Tukey's post-hoc test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 좌심실의 기능적 척도들의 변화

기준선의 LVDP, +dP/dt, 심박동수 및 LVEDP는 허혈 대조

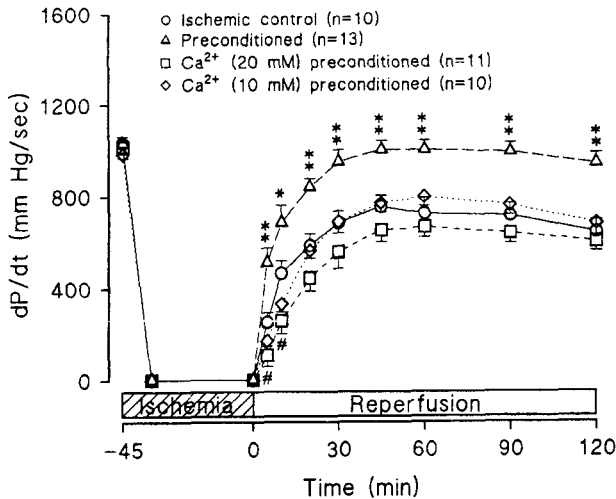


Fig. 3. Changes in the maximal left ventricular contractility (dP/dtmax) during ischemia and reperfusion. *p<0.05, **p<0.01, ischemic control vs preconditioned; #p<0.05, ischemic control vs Ca²⁺ preconditioned.

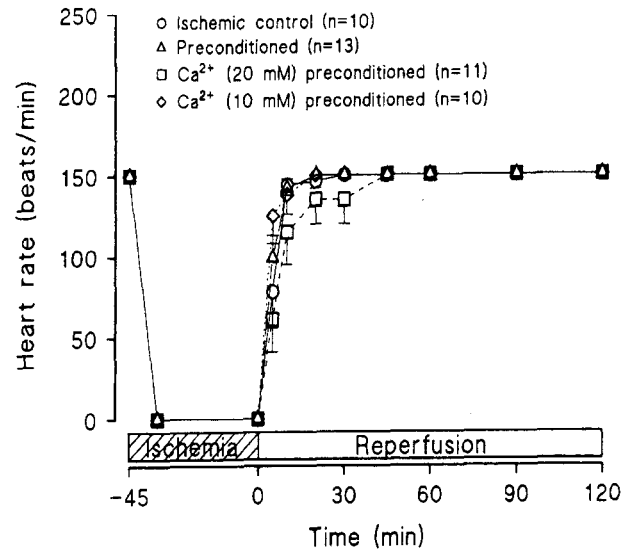


Fig. 4. Changes in the heart rate during ischemia and reperfusion.

군에서 각각 84±2.6 mm Hg, 1032±14 mm Hg/sec, 150±0 bpm(beats/min), 9±0.62 mm Hg, IP군에서 각각 84±4.7 mm Hg, 1031±31 mm Hg/sec, 150±0 bpm, 9±0.5 mm Hg, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 76±1.2 mm Hg, 983±18 mm Hg/sec, 150±0 bpm, 10±0.0 mm Hg, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 83±2.4 mm Hg, 1016±32 mm Hg/sec, 150±0 bpm, 10±0.3 mm Hg로 실험군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다. 재관류 시작으로부터 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 및 120분의 LVDP(left ventricular developed pressure, 즉 peak systolic pressure에서 end-diastolic pressure를 뺀 값)는 대조군에서 각각 13±3.5, 29±3.9, 41±3.5, 53±3.3, 56±3.7, 56±4.9, 52±4.1, 50±3.1 mm Hg, IP군에서 각각 34±7.0, 46±6.3, 61±5.0, 71±4.0, 78±2.9, 78±3.1, 77±3.2, 72±3.1 mm Hg, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 9±0.9, 18±2.0, 32±3.0, 43±4.4, 53±3.8, 53±3.4, 48±3.6, 43±4.3 mm Hg, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 8±3.2, 15±3.3, 29±4.7, 40±6.1, 47±5.2, 50±5.1, 46±5.0, 43±5.8 mm Hg로 LVDP는 모든 실험군에서 재관류 시간 경과에 따라 증가하였다가 대부분에서 재관류 후 45분경 부터는 서서히 감소하는 경향을 나타내었고, IP군은 허혈 대조군이나 칼슘 전처치군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 2; p<0.01).

재관류 시작으로부터 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 및 120분의 dP/dt의 최대값(dP/dtmax)은 대조군에서 각각 252±42, 465±55, 585±51, 684±51, 753±50, 724±68, 714±52, 642±54 mm Hg/sec, IP군에서 각각 511±63, 684±76, 838±40, 949±51, 1001±41, 1001±41, 990±42, 940±45 mm Hg/sec, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 170±23, 331±33, 563±34, 689±50, 769±38, 796±39,

760±43, 680±57 mm Hg/sec, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 107±48, 258±57, 444±56, 558±73, 651±49, 665±49, 637±43, 601±42 Hg/sec로 dP/dt의 최대값은 LVDP와 같이 재관류 시간 경과에 따라 증가하였으나 모든 군에서 재관류후 45분 경 부터는 일정히 유지되는 경향을 나타내었으며 허혈 대조군 과 칼슘 전처치군에 비하여 IP군에서는 유의한 증가를 볼 수 있었다(Fig. 3; p<0.01).

재관류 시작으로부터 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 및 120분의 심박동수는 대조군에서 각각 78±22, 144±6, 146±4, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0 bpm, IP군에서 각각 99±14, 142±6, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0 bpm, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 125±17, 138±12, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0 bpm, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 61±20, 115±20, 135±15, 135±15, 150±0, 150±0, 150±0, 150±0으로 심박동수는 모든 실험군에서 재관류후 20분 경부터 기준선 값을 유지하였고 실험군 사이에서 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4).

재관류 시작점과 재관류 시작으로부터 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 및 120분의 LVEDP는 대조군에서 각각 38±1.0, 56±7.8, 61±8.6, 61±7.0, 55±6.8, 54±6.8, 53±7.5, 50±5.9, 48±4.5 mm Hg, IP군에서 각각 27±3.7, 32±3.5, 34±3.8, 35±3.6, 33±3.1, 30±2.4, 29±2.8, 28±3.0, 28±3.4 mm Hg, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 32±3.9, 48±5.3, 56±5.9, 59±4.4, 54±3.6, 49±3.2, 46±3.3, 41±2.5, 37±2.2 mm Hg, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 26±3.4, 56±7.0, 60±6.8, 58±5.7, 53±5.1, 48±4.8, 43±4.0, 38±3.5, 34±3.3 mm Hg로 LVEDP는 재관류 초기에는

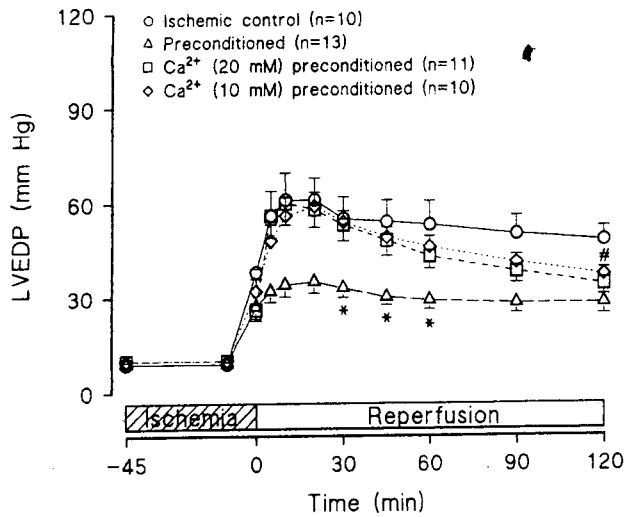


Fig. 5. Changes in the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) during ischemia and reperfusion.
* $p < 0.05$, Ca^{2+} preconditioned vs preconditioned; # $p < 0.05$, ischemic control vs Ca^{2+} preconditioned.

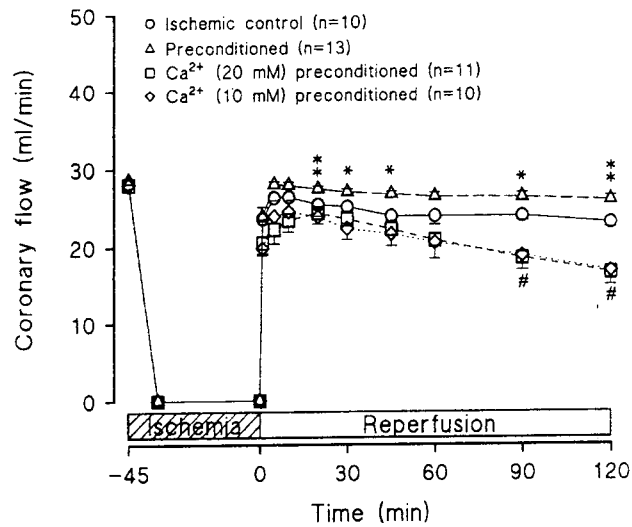


Fig. 6. Changes in the coronary flow during ischemia and reperfusion.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ischemic control vs preconditioned; # $p < 0.05$, ischemic control vs Ca^{2+} preconditioned.

상승하였다가 시간이 경과할수록 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 허혈 대조군과 칼슘 전처치군 사이에서는 유의한 차이가 없었으나 허혈 대조군에 비하여 IP군에서는 재관류 후 30-60분 사이에서 LVEDP의 상승폭이 현저히 낮았다 (Fig. 5; $p < 0.05$).

2. 관혈류(coronary flow)의 변화

기준선에서의 관혈류량은 허혈 대조군, IP군, 10 mM 및 20

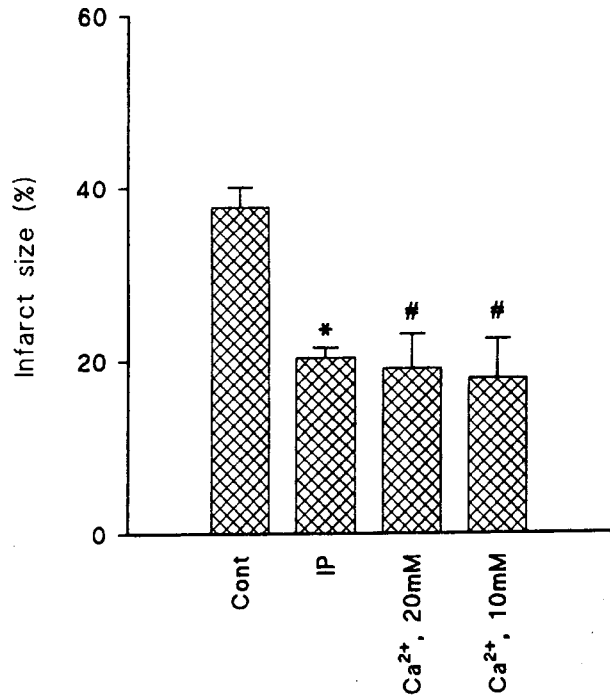


Fig. 7. Infarct size (% infarction/left ventricle). Cont, ischemic control; IP, preconditioned group.
* $p < 0.05$, ischemic control vs IP; # $p < 0.05$, ischemic control vs Ca^{2+} preconditioned.

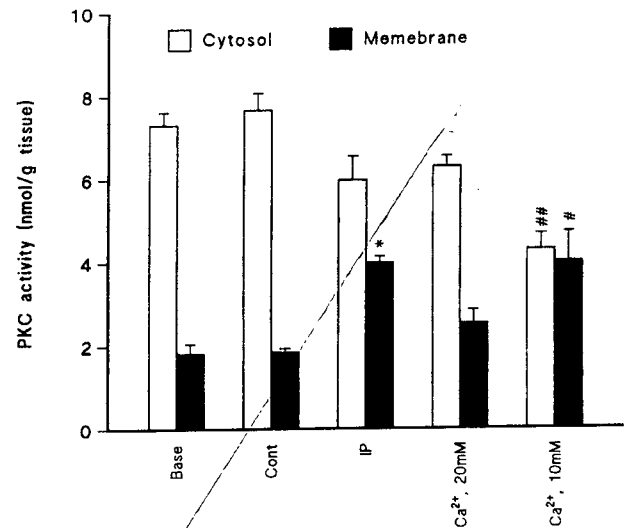


Fig. 8. Protein kinase C (PKC) activity. Base: baseline, Cont: ischemic control, IP: preconditioned.
* $p < 0.01$, baseline vs preconditioned # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, baseline vs Ca^{2+} preconditioned.

mM 칼슘 전처치군에서 각각 28.3 ± 0.2 , 28.6 ± 0.2 , 28.0 ± 0.2 , 28.0 ± 0.0 ml/min으로 서로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 재관류 시작점 및 재관류 시작으로부터 5, 10, 20, 30, 45, 60,

고 찰

90 및 120분의 관혈류량은 대조군에서 각각 23.6 ± 0.4 , 26.3 ± 0.3 , 26.4 ± 0.4 , 25.4 ± 0.5 , 25.1 ± 0.6 , 23.9 ± 0.6 , 23.9 ± 1.1 , 23.9 ± 0.6 , 23.0 ± 0.6 ml/min, IP군에서 각각 23.9 ± 1.2 , 28.0 ± 0.4 , 27.9 ± 0.4 , 27.4 ± 0.4 , 27.0 ± 0.4 , 26.7 ± 0.4 , 26.4 ± 0.5 , 26.3 ± 0.6 , 25.9 ± 0.6 ml/min, 10 mM 칼슘 전처치군에서 각각 19.8 ± 0.9 , 23.9 ± 0.9 , 24.5 ± 0.7 , 23.8 ± 0.9 , 22.3 ± 1.4 , 21.6 ± 1.5 , 20.5 ± 2.1 , 18.8 ± 1.9 , 16.8 ± 1.8 ml/min, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 20.5 ± 1.4 , 22.2 ± 1.8 , 23.4 ± 1.5 , 24.3 ± 0.4 , 23.5 ± 0.5 , 22.2 ± 0.7 , 20.8 ± 0.7 , 18.5 ± 0.9 , 16.6 ± 0.9 ml/min으로 관혈류량은 모든 군에서 재판류 직후 허혈전 값으로 증가하여 허혈 대조군과 IP군에서는 이 값을 계속 유지하였으나 칼슘 전처치군에서는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 IP군에서는 다른 실험군보다 관혈류의 현저한 증가를 볼 수 있었다(Fig. 6; $p < 0.01$).

3. 심근피사부위의 밀도

심첨에서 심저부에 이르기까지의 모든 절편(8~9개)을 TTC로 염색하여 검색한 결과 심근피사 부위는 대부분에서 심첨으로부터 4번까지의 절편에서 뚜렷히 관찰되었다. 심근피사부위의 크기(% IA/LVA)는 허혈 대조군, IP군, 10 mM 칼슘 전처치군, 20 mM 칼슘 전처치군에서 각각 37.7 ± 2.4 , 20.3 ± 1.2 , 19.1 ± 4.02 , $17.9 \pm 4.6\%$ 로 허혈 대조군과 비교하여 IP군과 칼슘 전처치군에서는 피사크기의 현저한 감소를 볼 수 있었다(Fig.7; $p < 0.05$). 그러나 IP군과 칼슘 전처치군 사이에서는 유의한 차이를 볼 수 없었다.

4. Protein kinase C(PKC)의 변화

기준선의 세포질분획 및 세포막분획의 PKC활성도는 각각 7.31 ± 0.31 , 1.83 ± 0.02 nmol/g tissue 이었다. 45분 동안 허혈만 실시한 허혈 대조군에서 세포질분획 및 세포막분획의 PKC활성도는 각각 6.90 ± 0.29 , 1.90 ± 0.31 nmol/g tissue 였으며, IP군에서는 각각 5.98 ± 0.21 , 4.00 ± 0.14 nmol/g tissue, 10 mM 칼슘 전처치군에서는 각각 4.19 ± 0.39 , 4.02 ± 0.70 nmol/g tissue, 20 mM 칼슘 전처치군에서는 각각 6.30 ± 0.24 , 2.50 ± 0.31 nmol/g tissue이었다.

이상으로 IP를 시행하거나 10 mM 칼슘 전처치를 실시하면 세포질분획의 PKC 활성도는 각각 기준선 값의 82%, 58%까지, 특히 10 mM 칼슘 전처치군에서 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$) 세포막분획의 활성도는 IP군, 칼슘 전처치군에서 각각 기준선 값의 220%까지 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 8; $p < 0.01$, baseline vs preconditioned; $p < 0.05$, baseline vs calcim preconditioned). 그러나 허혈 대조군에서는 세포질 및 세포막분획의 PKC 활성도에는 대조군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

본 실험에서는 적출 관류 심장을 이용, 관류를 차단하여 5분 동안 전체허혈후 높은 농도의 칼슘이 포함된 관류액(10 또는 20 mM CaCl_2 포함)으로 10분 동안 관류하는 방법으로 칼슘 전처치를 시행할 경우, 5분 동안의 허혈, 10분 동안의 재판류를 1회 실시하여 유도한 IP와 비교하여 45분 동안 허혈후 재판류시, 첫째, IP와 같이 심근보호 효과가 나타나며, 둘째, 칼슘 전처치로 심근보호 효과가 나타난다면 그 효과가 칼슘 의존성 또는 비의존성 PKC와 어떠한 연관성을 가지고 있는가를 알아보려고 하였다.

실험결과, IP없이 45분 동안 허혈만 실시한 허혈 대조군에 비하여 IP군에서는 LVDP, 심근수축력 등이 재판류후 45분경에 거의 기준선 값에 접근하였으며 LVEDP가 재판류 기간 동안 28~30 mm Hg 정도로 유지되어 50~60 mm Hg까지 상승한 허혈 대조군에 비하여 적어도 재판류후 30~90분 사이에서는 상승폭이 현저히 감소되었다. 관혈류량도 26~28 ml/min으로 유지되어 기능적 척도들의 회복은 IP군에서 현저히 증가하였으며 좌심실의 심근피사의 크기도 허혈 대조군에서 38%인데 비하여 IP군에서는 20%로 현저히 감소하였다. 모든 칼슘 전처치군에서는 기대하였던 것과는 달리 허혈후 재판류시 LVDP, 심근수축력, 심박동수에 있어서는 허혈 대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았다. LVEDP의 상승폭도 허혈 대조군보다는 대체로 낮았으나 전체적으로 큰 차이는 없었으며, 관혈류량은 재판류 90분 이후에는 허혈 대조군에 비하여 오히려 저하되었으나 심근피사 크기는 18~19%로 허혈 대조군 보다 현저히 감소하여 IP시 나타나는 심근피사 크기 감소 효과를 볼 수 있었다. 이와는 대조적으로 본 실험을 위한 예비실험에서 5 mM의 칼슘으로 전처치한 결과, 허혈후 재판류시 심근기능 회복 증진은 물론 피사범위의 감소도 볼 수 없었다(data not shown). 이상으로 볼 때 10~20 mM의 높은 농도의 칼슘으로 전처치하면 후속되는 장시간 동안의 허혈에 대하여 심근피사 범위가 크게 감소하는 보호효과가 있음을 알 수 있다¹²⁾.

김 호덕 등¹³⁾은 기니픽의 적출 심장을 이용하여 짧은 기간 동안 허혈후 재판류시 높은 농도의 칼슘으로 관류할 경우 심근세포에서 일어나는 변화들을 관찰한 바 있다. 그들은 10분 동안 전체 허혈후 20분 동안 4~8 mM의 칼슘을 포함한 관류액으로 관류하고 심근세포를 관찰한 결과 미세구조의 손상정도가 감소하여 외인성 칼슘 자극은 허혈 심근세포의 손상된 미세구조 회복에 기여하거나 손상의 악화를 방지하는 것으로 기술하였다. 정상 상태와는 달리 관류를 차단하여 장시간 동안 허혈을 유발할 경우 심근세포내로 유입되는 칼슘은 완전히 차단되거나 수축기중 유리될 수 있는 균형질세

망 등 세포소기관에 저장되어 있던 칼슘양은 아주 적기 때문에 상대적으로 칼슘 고갈과 같은 상태에 놓이게 된다. 이러한 상태에서 높은 농도의 칼슘을 포함한 관류액으로 재관류를 하게되면 국소적으로 파괴된 심근세포막을 통하여 많은 칼슘이 세포내로 유입되므로 여러 가지 변화들이 나타날 수 있다. 허혈시 심근세포내 자유칼슘의 증가로 세포손상이 일어났을 잘 알려져 있고 세포내 자유칼슘증가는 칼슘의존성 변성과정을 활성화하여 비가역적인 세포손상을 일으키며 실험적으로 세포내 자유칼슘은 비가역적인 세포손상이 일어나기전에 증가하는 것으로 밝혀져 있다. 또한 세포내 자유칼슘의 증가를 지연 또는 억제시킬 수 있는 방법으로 심근세포손상을 지연시킬 수 있었다. 그러나 일과성으로 허혈이 일어날 경우에는 칼슘 조절에 중심적인 역할을 하는 세포소기관(세포막, 근형질내세망, 미토콘드리아 등)이나 수축기구의 기능이 대부분 보전될 수 있기 때문에 오히려 칼슘과 같은 양성 변력성 약물을 투여하면 수축기능 회복에 도움이 될 수 있다는 실험 결과들이 보고된 바 있다⁸⁾. 본 실험에서도 허혈후 칼슘 전처리 시작점으로부터 좌심실 수축기압이 기준선 값보다 2~2.5배 이상 상승함을 관찰할 수 있었다(data not shown). 그러나 45분 동안의 허혈후 재관류시 좌심실 기능은 IP군에서 크게 향상된 것에 비하여 칼슘전처리군에서는 허혈 대조군과 비교하여 별다른 차이를 보이지 않았다. 그러나 Miyawaki 등¹⁷⁾은 적출 흰쥐 심장을 이용하여 칼슘 전처치를 네 번 실시하고 40분 동안 허혈후 30분 동안 재관류한 실험에서 심장기능 회복이 현저히 증가함을 관찰하였다. 그들은 칼슘고갈 용액과 칼슘포함 용액을 교대로 네 번 투여하는 방법으로 칼슘 전처치를 유도하였는데, 본 실험의 칼슘 전처리군에서 심장기능 회복 증가를 볼 수 없었던 것은 실험동물과 칼슘 전처리 유도방법이 서로 달라서 나타난 것으로 볼 수 있겠으나 타당성이 적다. 다른 한편으로 생각하면 이러한 현상은 첫째, 45분 동안 허혈후 재관류시 이미 높은 농도의 칼슘에 적응되었던 심근세포 수축기구가 정상 농도의 칼슘에 대하여 민감하게 반응하지 않음으로서 나타난 것이거나(높은 농도의 칼슘 자극으로 심근세포는 기절과 유사한 상태에 빠지며 재관류시에는 칼슘에 대한 반응이 저하된다) 또는 칼슘 전처치에 의하여 심근세포내 에너지 생산 기구의 활동이 일시적으로 억제되어 나타나는 현상으로 추측된다. 그러나 발생원인을 명확히 밝히기 위하여는 심근세포 수축기구를 형성하는 인자들에 대한 변화, 에너지 생산 기구 등의 변화에 대한 분자 생물학적인 접근이 뒤따라야 할 것이다.

Ytrehus 등¹⁴⁾은 PKC활성억제제인 staurosporine을 투여하면 심근괴사키 감소효과가 차단되나 PKC활성촉진제인 PMA (4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate)를 투여하면 괴사키가

감소됨을 관찰하고 특히 장시간 동안의 허혈시 PKC활성화는 IP효과에 필요한 조건일 것으로 추측하였다. 다시 말하면 IP로 심근세포에서는 adenosine 수용기점유(receptor occupancy)가 일어나며 PKC활성화로 이온 channel, 미세관(microtubule) 등 단백질효과기(protein effector)의 인산화로 활성화되고 이에 따라 심근수축력 증가가 수반되어 심근보호 효과가 나타나는 것으로 이해되고 있다. Armstrong과 Ganote¹⁵⁾는 인산효소(phosphatase; 인산효소는 serine, threonine 잔류물 등을 탈인산화시키는 것으로 알려짐)차단제인 okadaic acid를 사용하여 단백질효과기들을 인산화시킴으로서 심근보호효과가 나타남을 관찰하였고 Downey 등¹⁶⁾은 미세관활동을 억제하는 colchicine을 사용하여 IP효과가 차단됨을 확인하였다. Protein kinase의 심근세포를 포함한 다른 진핵세포에서의 기능은 아직도 완전히 이해되고 있지 않으나 세포의 종류에 따라 특이적이고 기질의 부분집합(subset)으로 세포내 신호전달체계와 깊은 연관성을 가지며 특히 PKC는 여러 가지 활성물질에 대하여 반응하는 것으로 알려져 있다. 허혈성 전처리시 적어도 일부에서 전압의존성 칼슘통로를 통하여 일시적으로 심근세포내 칼슘양이 증가하는데 이것이 하나의 방아쇠 역할을 함으로서 이로부터 PKC의 활성화가 일어나는 것으로 해석하고 있으며^{17,18)}, 칼슘 전처리시에도 이와 유사한 경로를 통하여 심근보호 기전이 나타나는 것으로 추측된다. 그러나 본 실험결과 IP군에서는 10 mM 칼슘 전처리군과는 달리 기준선 값에 비하여 세포질분획의 PKC의 감소는 현저하지 않았다. 이는 세포질분획의 PKC는 세포막분획에 비하여 월등히 많기 때문에 세포질분획의 PKC가 활성화되어 세포막으로 이동하였음에도 양적인 면에서는 현저하게 차이가 나지 않을 가능성도 있음을 나타낸 것으로 생각된다. 다시 말하면 세포질분획에서는 양적인 변화가 없었다 하더라도 세포막분획에서 현저하게 증가하였다는 것은 PKC가 세포막에서 세포막으로 전위(translocation)하였음을 나타내는 것이다. 이상을 종합하면, IP나 칼슘 전처치를 실시할 경우 비활성 PKC가 세포막과 같은 활동성이 큰 세포소기관에서 활성화되어 세포막에 존재하는 효과기들을 활성화시킴으로서 나타나는 것으로 믿어진다. 그러나 개를 이용한 실험에서는 PKC 활성촉진제를 투여하더라도 괴사범위의 정도에는 차이가 없었고¹²⁾, 더우기 돼지에서는 PKC차단제를 사용했음에도 오히려 괴사범위의 감소가 관찰되었다¹⁹⁾. 이와 같이 본 실험 결과와 상반된 결과가 나타난 이유는 IP자극으로 PKC활성화는 일어났으나 key protein의 인산화에는 영향을 미치지 못하였거나, 세포막분획 PKC의 총량은 증가하였음에도 특이적인 PKC 동종효소의 발현이 심근세포 보호에 관여할 수 있을 정도로 크지 않았던지, 또는 IP를 유도하는 방법 자체로 재관류에서는 PKC 등 분자생물학적인 인자보다는 기계적인 인

자에 의하여 심근기절현상을 감소시킬 수 없으므로 나타난 결과임을 배제하기 어렵다. 이상과 같이 실험동물이나 IP 유도방법에 따라 상반된 결과가 나타나는 점으로 볼 때 PKC가 IP효과와 관련성이 있다고 하더라도 일반적으로 관여하는 기전은 아닐 가능성도 있다.

결론

칼슘이 심근세포내의 PKC활성도에 어떤 영향을 미치는가를 확인하고자하여 적출관류 흰토끼 심장을 이용하여 허혈성전처치군, 허혈 대조군, 칼슘 전처치군으로 구분하여 좌심실기능, 관혈류, PKC활성도와 심근괴사 크기를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

IP를 실시한 결과, LVDP, 심근수축력, 관혈류 등은 허혈 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며 이완말기압의 상승폭은 저하되었고 심근괴사 크기는 감소하였다. 칼슘투여군에서는 LVDP, 심근수축력, 관혈류 등에는 허혈 대조군에 비하여 큰 차이가 없거나 오히려 저하되었으나 심근괴사 크기는 현저히 감소하였다. 세포질분획의 PKC활성도는 IP군, 칼슘투여군에서 기준선에 비하여 특히 10 mM 칼슘 전처치군에서 유의하게 감소하였으며, 세포막분획의 PKC활성도는 기준선에 비하여 IP군과 10 mM 칼슘 전처치군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 허혈대조군에서는 두 분획 모두 기준선과 비교하여 큰 차이가 없었다.

이상으로 적출관류 토끼심장에서 장시간 동안의 허혈전 높은 농도의 칼슘으로 전처치하면 허혈후 재관류시 심근기능의 회복증가는 기대하기 어려우나 IP와 유사한 심근괴사 범위 감소효과가 있으며 이러한 효과는 아마도 칼슘의 매개에 따라 PKC활성화가 일어남으로서 나타나는 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 1983; 52:72A-81A.
2. Hearse DJ, Yellon DM. Why are we still in doubt about infarct size limitation? The experimentalist's viewpoint. In: Hearse DJ, Yellon DM, eds. *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation*. New York, Raven Press, 1984, pp 17-41.
3. Murry CE, Jennings RB, Kloner RA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-36.
4. 김호덕, 김대중, 이재경, 심태섭, 라봉진. Preconditioning

- 이 허혈-재관류 토끼심장에 미치는 영향에 관한 연구. *대한순환기학회지* 1992; 22:418-30.
5. 류호준, 박준수, 김현, 유언호, 라봉진, 김호덕. Ischemic preconditioning의 심근보호 효과에 관한 연구: 좌심실기능, 심근경색부위, protein kinase C 등에 대한 영향. *순환기* 1996; 26:541-52.
6. Li Y, Vasquez J, Gallagher K, Lucchesi B. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 1990; 82:609-19.
7. Nao B, McClanahan T, Groh M, Schott R, Gallagher K. The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* 1990; 82(Suppl III):III-271.
8. Kim DJ, Kim H, Park JI, Shim TS, Rah BJ, Kim HD. Relation between ischemic preconditioning and the duration of sustained ischemia. *J Korean Med Sci* 1995; 10: 121-31.
9. Kim HD, Rah BJ. Effects of diltiazem on isoproterenol or Ca-induced ventricular myocardial cell injuries in isolated perfused rabbit heart: an electron microscopic study. *Anat Rec* 1988; 222:260-71.
10. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991; 68:1250-8.
11. Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M. Ca²⁺ preconditioning elicits a unique protection against the Ca²⁺ paradox injury in rat heart: role of adenosine. *Circ Res* 1994;74:360-7.
12. Przyklenk K, Hata K, Kloner RA. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997;96:1305-12.
13. 김호덕, 전상배, 라봉진. 재관류시 외인성 칼슘 자극이 허혈 심근에 미치는 영향에 대한 전자현미경적 연구. *한국전자현미경학회지* 1991;21:1-20.
14. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266:H1145-52.
15. Armstrong SC, Ganote CE. Effects of protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischaemic isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:869-84.
16. Downey JM, Liu Y, Ytrehus K. Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning. In: Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM, eds. *Ischemic Preconditioning. The Concept of Endogenous Cardioprotection*. Boston, Kluwer, 1994, pp 137-52.
17. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 80:790-9.
18. Node K, Kitakaze M, Sato H, et al. Role of intracellular Ca²⁺ in activation of protein kinase C during ischemic preconditioning. *Circulation* 1997; 96:1257-65.
19. Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit T, Schaper W. Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig hearts in vivo. *Circulation* 1994;90(Suppl I): I-647.

=국문초록=

연구배경: 짧은 기간 동안 허혈-재관류를 반복(ischemic preconditioning, IP)할 경우 후속되는 보다 긴 기간 동안의 허혈에 대하여 재관류시 심근의 수축기능 회복이 증가, 심근괴사 범위 감소 등의 심근보호효과가 있음은 여러 가지 동물실험으로 밝혀졌으며 인간의 심장에서도 유사한 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있다. 최근 칼슘이 매개가 되어 protein kinase C(PKC)의 활성화가 일어남으로서 IP효과가 나타날 것이라는 실험결과들이 제시되고 있으나 논란이 많다. 본 연구에서는 적출 토끼심장을 이용하여 칼슘이 심근세포내의 PKC 활성화에 어떤 영향을 미치는가를 연구하고자 하였다. **대상 및 방법:** 적출관류 흰토끼 심장을 이용하여 관류를 차단하는 방법으로 전체허혈을 유도하였으며 전체허혈(5분), 재관류(10분)를 1회 실시하여 IP를 유도하고 45분 동안 전체허혈후 120분 동안 재관류를 실시하였다(IP군, n=13). 허혈 대조군(n=10)에서는 IP없이 45분 동안 전체허혈후 120분 동안 재관류를 실시하였다. 칼슘투여군에서는 5분 동안 허혈후 10분 동안 10(n=10) 또는 20 mM(n=11)의 칼슘을 포함한 관류액으로 관류하고 이어서 45분 동안 전체허혈과 120분 동안 재관류를 실시하였다. 전 실험 기간 동안 좌심실기능, 관혈류를 측정하였으며 실험 종료 후 PKC-specific peptide와 ^{32}P - γ -ATP incorporation으로 PKC활성도(nmol/g tissue)를 측정하였다. 심근괴사 크기는 1% tetrazolium chloride로 염색하여 형태계측하였다. **결과:** IP를 실시한 결과, LVDP(left ventricular developed pressure), 심근수축력, 관혈류 등은 허혈 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며($p<0.05$) 이완말기압의 상승폭은 저하되었고($p<0.05$) 심근괴사 크기는 38%에서 20%로 감소하였다($p<0.05$). 칼슘투여군에서는 LVDP, 심근수축력, 관혈류 등에는 허혈 대조군에 비하여 큰 차이가 없거나 오히려 저하되었으나 심근괴사 크기는 19~23%로 현저히 감소하였다($p<0.05$). 세포질분획의 PKC활성도(nmol/g tissue)는 IP군, 칼슘투여군에서 각각 5.98 ± 0.57 , 6.30 ± 0.24 (20 mM 칼슘 전처치군), 4.19 ± 0.39 (10 mM 칼슘 전처치군)로 기준(7.31 ± 0.31)에 비하여 특히 10 mM 칼슘 전처치군에서 유의하게 감소하였으며($p<0.01$), 세포막분획의 PKC활성도는 각각 4.00 ± 0.14 , 2.50 ± 0.31 , 4.02 ± 0.70 으로 기준(1.84 ± 0.21)에 비하여 IP군과 10 mM 칼슘 전처치군에서 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 그러나 허혈대조군에서는 두 분획 모두 기준선과 비교하여 큰 차이가 없었다. **결론:** 이상으로 적출관류 토끼심장에서 장시간 동안의 허혈전 높은 농도의 칼슘으로 전처치하면 허혈후 재관류시 심근기능의 회복증가는 기대하기 어려우나 IP와 유사한 심근괴사 범위 감소효과가 있으며 이러한 효과는 아마도 칼슘의 매개에 따라 PKC활성화가 일어남으로써 나타나는 것으로 생각된다.

- 중심단어: 1. 재관류
2. 칼슘
3. Protein kinase C 활성화