

흰쥐의 적출심장에서 Atrial Natriuretic Peptide (ANP) 유리에 미치는 요인에 관하여

김성주 · 이금영 · 조경우*

신북대학교 자연과학대학 생물학과, 의과대학 생리학교실*

Atrial natriuretic peptide(ANP)의 유리기전에 대한 특성을 알아보고자, 흰쥐의 적출심장 관류모형을 사용하여 연구한 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 1. 심방을 확장시켰을 때 ANP의 유리는 촉진되었다. 그러나 과용량을 부하하면 확장기간보다 회복기간에 ANP의 유리가 현저하게 증가하였다. 2. Epinephrine과 phenylephrine을 주입하면 ANP의 유리량이 증가했으나, isoproterenol을 주입하면 심박수와 우심방 내압이 현저하게 증가했는데도 ANP의 유리량은 오히려 감소하였다. 3. 미주신경을 자극하면 심박수의 현저한 감소에도 불구하고 ANP의 유리량은 증가하였다. 이상과 같은 결과에서 볼 때 결론적으로, 심방의 용량부하에 의해 심방근의 신장수용체가 자극을 받아 ANP의 유리가 촉진되는 것은 분명하고, 심방근이 확장할 때 보다는 확장 후 다시 원래의 길이로 환원될 때 ANP가 유리될 것으로 사료된다. 그리고 ANP의 유리에 대한 adrenergic조절은 α -receptor가 관련되어 있으며 심박수와 심방내압이 ANP의 유리를 변화시키는 데는 반드시 필수적인 인자가 아닌 것으로 여겨진다. 또한 특히 미주신경의 자극으로도 ANP의 유리가 조절될 수 있다는 것이 본 연구를 통해 새로이 발견되었다.

KEY WORDS : Secretion of ANP, Atrial distension, Adrenergic agonists, Vagal stimulation, Isolated rat heart

최근 심장에서 유리되는 호르몬인 atrial natriuretic peptide(ANP)가 생체내에서 여러가지 생물학적 작용을 나타내고 있음이 보고되었는데, 특히 신장의 혈류동력학에 있어서 ANP는 평균혈압을 감소시키며, 사구체 여과율과 뇨 및 sodium과 potassium의 배설율을 증가시키고, 유리수분 제거율의 현저한 변화없이도 뇨의 삼투농도를 감소시킨다(Maak *et al.*, 1984; Burnett *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1985; Lee and Cho, 1986). 또한 ANP는 renin과 aldosterone의 분비를 억제하는 효과가 있는데, 이러한 분비억제 작용은 특히 혈중 renin과 aldosterone의 농도가 높아져 있는 경우에 더욱 현저하게 나타난다(Atarashi *et al.*, 1984; Goodfriend *et al.*, 1984; Freeman *et al.*, 1985). 이러한 보고는 ANP가 혈압조절과 체액량 및 전해질의 항상성을 유지시켜 주는 중요한 기전의 하나인 renin-angiotensin system과 상호관련성이 있음을 시사해 준다. 이밖에도 ANP는 혈관 평활근을 이완시켜 순환 혈류량을 증가시키는 작

용도 한다(Garcia *et al.*, 1984; Napier *et al.*, 1984; Ohlstein *et al.*, 1985).

이와 같이 ANP의 생리적 기능에 대한 연구가 많이 수행되었음에도 불구하고, ANP의 유리기전에 대해서는 아직까지도 명확한 결론을 얻지 못하고 있는 실정이다. 그러나 ANP의 유리기전에 대해서는 다음과 같이 몇가지로 구분하여 살펴볼 수 있다. 첫째로, 용량의 부하를 들 수 있다. Dietz (1984)는 흰쥐의 심폐기모형(heart-lung preparation)에서 central venous pressure를 증가시킴으로써 ANP의 유리가 촉진됨을 관찰하였고, Lang 등(1985)은 체내와 체외실험을 통해 체액량이나 관류액량을 증가시켜서 심방이 확장했을 때 심방 세포로부터의 ANP유리가 증가된다고 보고하였다. 그리고 심방내에 작은 고무풍선을 넣어 심방을 확장시켰을 때(Bilder *et al.*, 1986)와 승모관 협착으로 심방의 압력을 증가시켰을 때(Ledsome *et al.*, 1985)에도 ANP의 유리가 촉진된다고 보고하였다. 이밖에도 실험방법은 다르나 궁극적으로

는 심방의 용량이나 내압을 변화시킴으로써 ANP의 유리량에 증감이 유발된다는 사실을 보고한 예가 많다(Ruskoaho *et al.*, 1986; Agnoletti *et al.*, 1987; Dietz, 1987; Garcia *et al.*, 1987; Onwochei *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1988; Paganelli *et al.*, 1988). 이들의 연구결과는 용량과 압력이 부하될 때, 심방의 확장으로 인하여 심방근 섬유에 있는 신장수용체(stretch receptor)가 흥분되어 심방세포내의 ANP유리가 촉진하는 것으로 설명되고 있다. 그런데 이러한 결과들은 심방이 확장될 때 얻어졌음에 반하여, 최근에 Cho 등(1988)은 심방이 확장되었다가 다시 본래의 크기로 환원될 때 ANP가 유리된다는 매우 흥미로운 결과를 보고하였다. 둘째로는, 약물의 자극도 ANP유리량에 증감을 초래하는 점이다. Sonnenberg와 그의 공동연구자들(Sonnenberg and Veress, 1984; Sonnenberg *et al.*, 1984)은 흰쥐의 심방조직의 배양액에 epinephrine과 Acetylcholine 그리고 vasopressin을 첨가했을 때는 ANP의 유리가 촉진되나, isoproterenol을 첨가했을 때는 ANP의 유리에 아무런 영향을 주지 않는다는 사실을 관찰하였다. 이와 같은 사실은 다른 연구자들에 의해서 유사한 실험모형(Naruse *et al.*, 1986)이나 적출심장의 관류모형(Ruskoaho *et al.*, 1985; Toth *et al.*, 1986; Currie and Newman, 1986)에서도 확인되었다. 즉 ANP의 유리가 muscarinic cholinergic과 α -adrenergic 그리고 vasopressin receptor의 자극에 의해서 촉진될 수 있다는 것이 시사되었다. 그러나 어떤 연구자들은 isoproterenol을 주입했을 때 ANP의 유리량이 증가됨을 관찰하여, ANP의 유리량에 관한 adrenergic 조절은 α -보다는 β -adrenergic receptor에 의해 중재된다고 역설하고 있다(Gibbs, 1987; Rankin *et al.*, 1987a). 그리고 Schiebinger와 Linden(1986a)은 α -와 β -adrenergic receptor가 모두 관여한다고 보고하고 있어서, ANP의 유리에 대한 adrenergic receptor의 관련성은 논란의 여지가 많다고 생각된다. 셋째로, 심박수의 변화를 들 수 있다. 즉, 발작성 빈맥이 있는 환자에서 혈중의 ANP농도가 증가되어 있음이 보고되었고(Schiffirin *et al.*, 1985; Yamaji *et al.*, 1985), Rankin 등(1986)은 토끼의 심방을 전기자극하여 심박수를 증가시켰을 때 ANP의 혈

중 농도가 증가함을 관찰하여 심박수와 ANP의 상호관련성을 시사하였다. 넷째로, 신경계를 경유한 ANP의 유리이다. 즉 교감신경을 자극했을 때 심박수의 현저한 증가에도 불구하고 ANP유리의 촉진현상은 관찰되지 않았고(Ledsome *et al.*, 1986; Rankin *et al.*, 1987b), 미주신경을 자극했을 때에도 심박수는 현저히 감소했으나 ANP의 유리량에는 변화가 없다고 보고되었다(Rankin *et al.*, 1987b).

이에 본 연구에서는 흰쥐의 적출심장 관류모형을 이용하여, 심방이 용량의 부하에 의해 확장될 때의 ANP유리현상을 관찰하고, 자율신경 중 특히 adrenergic receptor를 자극하는 약물을 사용하여 논란이 되고 있는 α -와 β -adrenergic receptor의 관련성을 추적하고 ANP의 유리량과 심박수의 관련성도 확인하며, 부교감신경계를 통한 ANP유리량의 증감현상등 다양하게 ANP의 유리기전에 관한 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

연구재료

연구재료인 실험동물은 체중 200~300 gm의 정상혈압의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 암수 구별없이 사용하였다. 특히 실험전 1주일 동안은 자연채광 상태에서 물과 사료를 충분히 공급하고 안정된 상태에서 실험에 착수하였다.

연구방법

1) 심장적출 및 관류장치

흰쥐를 ether로 가볍게 마취하여 수술대 위에 양와위로 사지를 결찰한 뒤, 대퇴정맥을 통해 heparin(500 IU/Kg)을 주사하고 약 2분뒤에 정중 개흉한 다음, 심장을 적출하여 4°C의 생리식염수에 넣었다. 적출된 심장을 Choi 등(1988)이 고안한 변형된 적출심장관류기에 매달고, 비작업성 심장순환(Langendorff perfusion, non-working heart circulation)을 실시하였다. 관류액은 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 용액을 사용

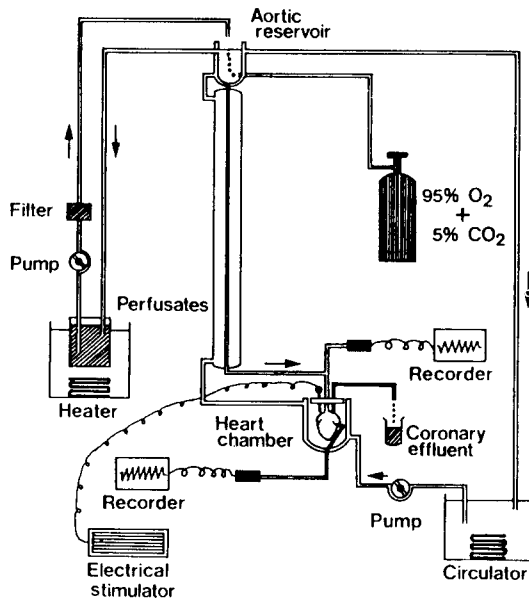


Fig. 1. Schematic drawing of the experimental setup.

하였으며, 이는 실험장치 내에서 순환되면서 37.5°C로 가온되고, 95%의 산소와 5%의 이산화탄소의 혼합가스로 기포화되어 산소분압은 약 450~500 mmHg이고 이산화탄소의 분압은 31~34 mmHg로 유지시켰다. 이때의 pH는 7.4로 조절하였다. 그리고 관류액을 30 μ m의 동맥혈류 여과장치(arterial blood filter, Harvey Co.)에 통과시키면서 변질된 단백질이나 침전물은 제거하였다(Fig. 1).

2) 적출심장에 대한 심방확대와 약물주입 및 전기자극

심방의 용량확대 실험을 하기 위하여, 하대정맥을 통하여 작은 고무풍선을 심방의 정중부에 위치하도록 조작하였다. 이때 상대정맥은 심근외로 적출된 심장이 관류장치에서 안정되도록 약 20분간 관류액을 관류시킨 다음, 대조군과 실험군으로 구분하였다. 이때 실험군에서는 삽입된 고무풍선내에 생리식염수를 50, 100, 200 그리고 400 μ l까지 증량하여 우심방을 확장시켰다. 여기서 나타나는 혈류동력학적 성적, 즉 대동맥의 맥압(aortic pulse pressure)과 우심방내압(right atrial pressure) 그리고 심박수(heart rate)는 실험

장치에 연결된 pressure transducer를 통하여 Dynograph(Sensor Medics, U.S.A.)에 기록하였으며, irANP(immunoreactive atrial natriuretic peptide)의 농도를 측정하기 위해 폐동맥으로 순환되어 나오는 관류액을 4°C의 물 속에서 ANP 안정제(0.1 N acetic acid + 0.1% bovine serum albumin)가 들어있는 용기에 채집하였으며, 이것을 관류량(coronary flow)으로 삼았다. 측정은 모두 2분 간격으로 하였다.

약물의 주입은 각 농도별로 infusion pump를 이용하여 1 ml/min의 속도로 대동맥을 통하여 주입하였다. 그리고 미주신경의 전기적 자극은 전기자극기(San-ei, Japan)를 이용하여 2 V, 1 ms, 15 Hz의 구형파로 1분간 자극하였다.

3) irANP 농도를 측정하기 위한 Radioimmunoassay

Sep-Pak C₁₈ cartridge를 4 ml의 acetonitrile과 4 ml의 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)로 활성화시킨 뒤 2 ml의 관류액을 첨가하였다. Cartridge를 4 ml의 0.1% TFA로 세척한 뒤 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 흡착된 ANP는 60%의 acetonitrile 2 ml로 elution하고 polyethylene용기에 채집하여 Speed-Vac(Savant, U.S.A.)으로 건조시켰다. 추출된 관류액내의 ANP는 assay buffer 100 μ l로 복원하여 방사면역측정법으로 측정하였다. 이때 회복률은 70.0 \pm 2.5%로 이를 교정하였다. APIII(atriopeptin III)에 대한 항체는 Research and Diagnostic Antibodies사에서 구입하였다.

¹²⁵I-APIII의 제조를 위한 iodination은 chloramine-T method에 의존하였다(Cho *et al.*, 1988). 즉 sodium phosphate buffer(pH 7.4, 0.5 M) 25 μ l가 들어있는 Eppendorf tube에 5 μ g/5 μ l의 APIII(Peninsula Lab.)와 sodium iodide-125(1 mCi/10 μ l, Amersham 사) 10 μ l를 혼합한다. Iodination하기 직전에 만든 chloramine-T(1.0 mg/ml) 10 μ l를 첨가한 뒤 실온에서 40초간 조심스럽게 혼합하고, 30% bovine serum albumin(BSA) 200 μ l를 넣어 반응을 정지시킨 뒤, Sephadex G-25 column에 주입하고 0.1 N acetic acid로 0.5 ml/min의 속도하에서 elution하였다. Elution buffer는 0.3% BSA와 0.

3% lysozyme 및 0.1% glycine이 포함된 0.1 N acetic acid였으며, fractionation을 하기 위한 tube에는 1,000 KIU/ml의 aprotinin이 함유된 elution buffer 3 ml을 가하여 높은 radioactivity로 인한 APIII의 파괴를 방지하였다. 약 1.0 ml씩 fractionation한 직후 잘 혼합하여 25 μ l에 들어 있는 radioactivity를 측정하고, iodination된 APIII의 peak에 해당하는 fraction은 3,000, 000 cpm/tube가 되도록 분주하여 -20°C 에 보관하고, tube 당 8,000 cpm이 되도록 하여 사용하였다. irANP 농도의 radioimmunoassay는 0.2% neomycin, 10 M EDTA, 50 BAEE/ml soybean trypsin inhibitor(SBTI), 4 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 0.02% sodium azide 및 1% BSA가 포함된 0.1 M tris-acetate buffer(pH 7.4)를 사용하여 실시하였다. Assay는 통상적인 RIA 방법에 따랐는데, 100 μ l의 antiserum과 시료 100 μ l를 혼합하고 4°C 에서 24시간 incubation한 후 동량의 ^{125}I ANP를 첨가하고 다시 4°C 에서 24시간 incubation하였다. 그 후 charcoal suspension을 이용하여 bound form과 free form을 분리하고, gamma counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

4) 통계처리

실험결과와 통계처리는 Student paired t-test에 준하였고(Snedecor, 1967), p-value가 최소치 0.05 이상일 경우 유의한 것으로 판정하였다. 실험치의 표현은 mean \pm S.E.로 하였다.

결 과

1. 용량부하에 의한 심장기능 및 ANP유리량의 변화

적출심장의 하대정맥을 통하여 작은 고무풍선을 우심방내로 넣은 후 50, 100, 200, 400 μ l의 용량부하를 주어 우심방을 확장시켰을 때 나타난 심장기능과 ANP유리량의 변화상은 다음과 같다.

우심방을 50 μ l와 100 μ l로 확장시켰을때, 대동맥의 맥압은 변화가 없었으며, 심박수는 약 293 beats/min의 대조군에 비해 현저히 증가하였다.

ANP유리량의 변화는, 관류액내의 ANP농도에 있어서 약 0.55 ng/ml의 대조군에 비하여 증가하였는데, 특히 100 μ l의 용량을 부하했을때 2분 후에 $0.98 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.05$), 그리고 4분 후에는 $1.10 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.01$)로 현저하게 증가하였다. 용량부하를 제거한 회복기에는 시간의 경과에 따라 대조군과 비슷한 농도가 측정되었다. 또한 관류액을 통해 분당 유리된 ANP의 양에 있어서도 비슷한 변화상이 관찰되었다(Fig. 2).

우심방을 200 μ l와 400 μ l로 용량을 더욱 증가

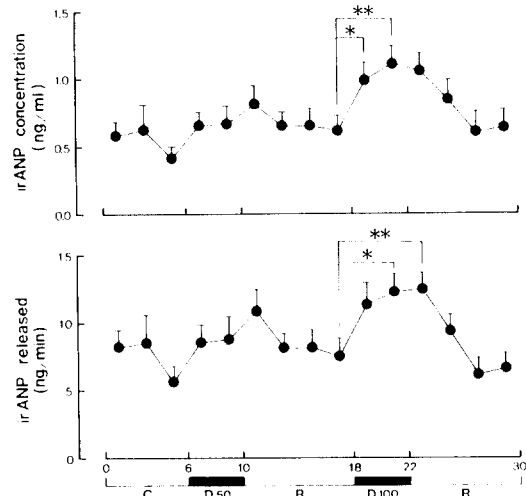


Fig. 2. Effect of atrial volume expansion on secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat heart. Values represent the means \pm S. E. M. from seven hearts. C, control; D50, 50 μ l distension; D100, 100 μ l distension; R, recovery period. Asterisks indicate significant difference from control values by paired t-test (* = $p < 0.05$ & ** = $p < 0.01$).

시켜 부하했을 때, 심박수는 현저히 증가했으며 관류액내의 ANP유리량은 특히 400 μ l의 용량을 부하했을 때 매우 유의한 감소현상을 나타냈다. 이때 얻어진 ANP유리량의 변화는, 200 μ l의 용량확장시에는 확장시기에 대조군보다 약 2배가량 유리량이 증가했으나 회복기의 2분 후에도 약 5배 정도의 높은 유리량 증가현상이 나타났다. 그런데 400 μ l의 용량을 부하했을 때에는 매우 특이한 현상이 관찰되었다. 즉 400 μ l의 용량을 부하하면 대조군에 비해 약 70% 이상의 유리 감소현상이 나타

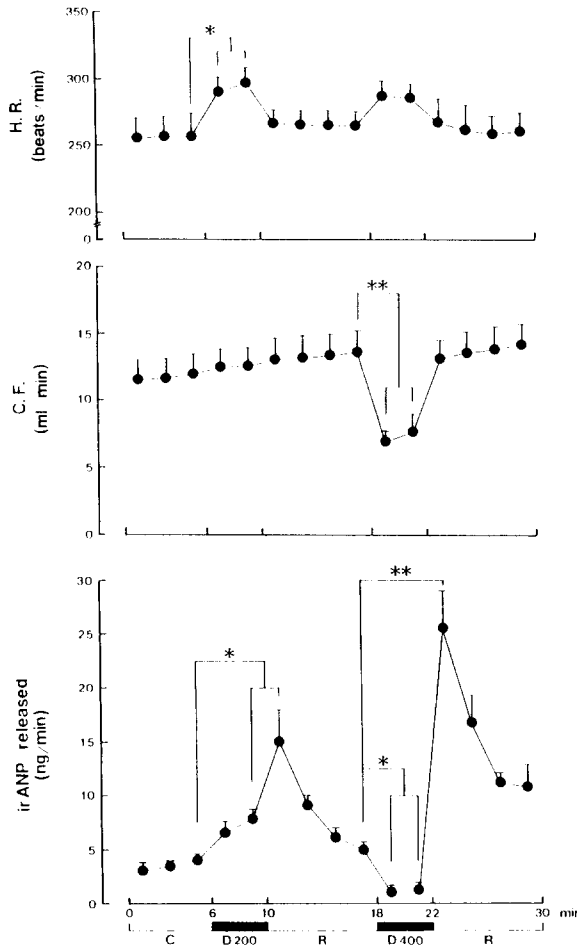


Fig. 3. Effect of atrial volume expansion on heart rate (H. R.), coronary flow (C. F.) and secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat heart (n = 7). D200, 200 μ l distension; D400, 400 μ l distension. Other legends are the same as in Fig. 2.

났다. 이때 확장된 우심방의 용적을 본래의 상태로 회복시키면, 확장시기에 비해 ANP유리량이 무려 20배 이상 증가됨이 관찰되었다. 이러한 현상은 회복시간의 경과에 따라 감소하는 양상이었으나 회복 8분 후에도 대조군에 비해 약 2배 정도 높은 ANP유리 현상이 나타났다(Fig. 3).

2. Adrenergic receptor agonist의 주입으로 인한 심장기능과 ANP유리량의 변화

1) Epinephrine의 효과

Epinephrine을 1.0 μ g/ml/min의 농도로 심장에 주입했을 때, 대동맥의 맥압은 대조군에 비

해 약 1.5배 이상 증가했으며 약물의 농도를 3.0 μ g/ml/min으로 증가시켜 주입하면 주입한 농도에 비례적인 증가폭을 나타냈다. 심박수의 변화에 있어서도 주입한 epinephrine의 농도에 따라 비례적으로 유의하게 증가하였다(p < 0.01). 그러나 관관류량은 감소하였다. 이때 유리된 ANP의 양은, epinephrine을 1.0 μ g/ml/min으로 주입했을때 대조군에 비해 약 2배 가량 증가했으나 약물의 주입을 멈춘 회복기에는 점차 유리량이 감소되었다. 회복 후 epinephrine의 농도를 3.0 μ g/ml/min으로 늘려서 계속 주입하면, ANP의 유리량이 약물주입 2분 후부터 점차 증가하여 약물주입을 멈춘 회복기의 4분 후까지도 유리량의 증가현상이 나타났다(Fig. 4).

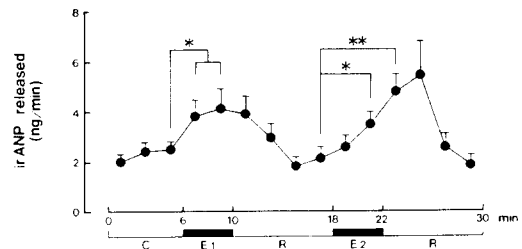


Fig. 4. Effect of epinephrine infusion on secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat heart (n = 9). E1, 1.0 μ g/ml/min; E2, 2.0 μ g/ml/min. Other legends are the same as in Fig. 2.

2) Phenylephrine의 효과

α -adrenergic receptor를 특이하게 자극하는 약물인 phenylephrine을 3.0 그리고 10.0 μ g/ml/min의 농도로 심장에 주입했을 때, 대동맥의 맥압은 대조군에 비해 유의하게 증가했으며(p < 0.05, 0.01) 이는 약물주입을 중지하자 곧 회복되었다. 우심방의 내압변화를 알아보기 위하여, 하대정맥을 통해서 우심방에 생리식염수로 충만된 catheter를 삽입하여 우심방의 내압을 측정하였다. Phenylephrine을 주입하면 우심방의 내압이 증가되었는데 이는 통계적으로 유의한 증가현상은 아니었다. 또한 심박수는 주입된 phenylephrine의 농도에 따라 비례적으로 증가했지만, 관관류량에 있어서는 오히려 유의하게 감소하였다(Table 1). ANP의 유리량은 대조군에 비해 현

Table 1. Effects of phenylephrine infusion on cardiac hemodynamics in isolated perfused rat heart.

Time (min) Determination	C		P1		R				P2		R				
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30
Aortic pulse pressure (mm Hg)	29.09 ± 3.48	28.94 ± 3.27	29.16 ± 3.25	35.47** ± 2.86	37.81** ± 2.63	35.63 ± 2.71	32.81 ± 3.61	33.03 ± 3.61	32.19 ± 3.40	39.22* ± 2.31	41.72** ± 2.02	36.56 ± 2.37	30.47 ± 3.35	30.47 ± 3.71	28.75 ± 3.28
Right atrial pressure (mm Hg)	0.79 ± 0.15	0.79 ± 0.15	0.82 ± 0.16	0.99 ± 0.17	1.12 ± 0.23	0.91 ± 0.23	0.82 ± 0.17	0.79 ± 0.15	0.77 ± 0.14	1.15 ± 0.23	1.16 ± 0.27	0.99 ± 0.20	0.82 ± 0.17	0.79 ± 0.15	0.74 ± 0.14
Heart rate (beats/min)	275.00 ± 14.69	274.00 ± 15.25	274.00 ± 15.43	272.00 ± 12.95	285.00* ± 13.25	282.00 ± 15.11	273.50 ± 17.02	277.50 ± 17.31	274.50 ± 16.22	294.00 ± 10.07	310.50* ± 11.53	295.50 ± 15.98	282.00 ± 17.89	270.00 ± 18.87	273.50 ± 16.22
Coronary flow (ml/min)	12.54 ± 1.57	12.24 ± 1.52	12.26 ± 1.49	10.86** ± 1.39	10.87* ± 1.14	11.69 ± 1.14	11.55 ± 1.26	12.21 ± 1.41	12.10 ± 1.34	10.49** ± 1.19	11.27 ± 1.09	11.84 ± 1.11	11.43 ± 1.18	11.19 ± 1.31	11.51 ± 1.44

Values represent the mean ± S. E. M. from eight hearts. P1, 2.0 μg/ml/min; P2, 10.0 μg/ml/min. Other legends are the same as in Fig. 2.

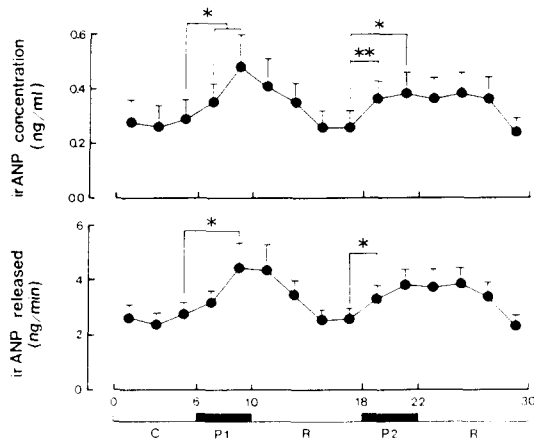


Fig. 5. Effect of phenylephrine infusion on secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat heart (n = 8). Other legends are the same as in Fig. 2 and Table 1.

서히 증가했으나, 주입한 phenylephrine의 농도에 비례적인 증가현상은 아니었다. 이러한 증가현상은 관류액내의 ANP농도 및 분당 유리된 양에 있어서 모두 비슷하였다(Fig. 5).

3) Isoproterenol의 효과

β -adrenergic receptor만 특이하게 자극하기 위하여 적출심장에 isoproterenol을 농도변화를 주어 주입하였을 때, 대동맥의 맥압은 약 1.5배 이상 증가했으며 우심방의 내압도 증가하였다. 특히 심박수는 현저한 변화가 나타났다. 즉 약 274 beats/min의 대조군에 비해 363.33 ± 19.76 beats/min으로 현저히 증가했으나($p < 0.01$), 회복기 8분 후에는 완전히 원상으로 회복되었다. 그러나 이러한 심박수의 변동은 주입한 isoproterenol의 농도에 비례하지는 않았다. 관류량에 있어서는 epinephrine과 phenylephrine을 주입했을 때와는 달리 유의하게 증가하였다. 관류액을 통하여 유리된 ANP농도는 isoproterenol을 농도별로 주입했을 때 대조군과 비교해서 약 0.28 ng/ml에서 0.16 ng/ml로, 그리고 0.27 ng/ml에서 0.21 ng/ml로 오히려 유의하게 감소하는 경향이였다. 또한 분당 유리된 ANP의 양에 있어서도 isoproterenol의 주입으로 인하여 감소되는 현상을 보여주었다(Fig. 6).

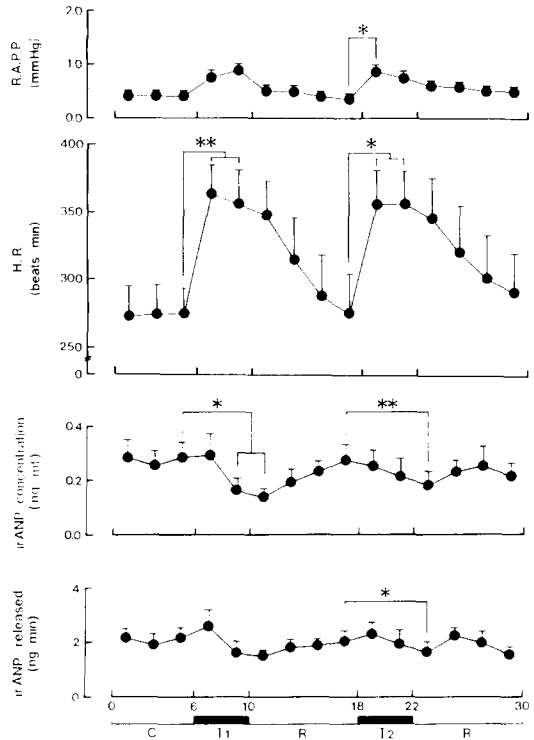


Fig. 6. Effect of isoproterenol infusion on right atrial pulse pressure (R. A. P. P.), heart rate (H. R.) and secretion of atrial natriuretic peptide in isolated perfused rat heart (n = 6). I1, 0.03 μ g/ml/min; I2, 0.1 μ g/ml/min. Other legends are the same as in Fig. 2.

3. 미주신경의 자극에 의한 심장기능과 ANP유리량의 변화

부교감신경을 통한 ANP유리량의 변화현상을 알아보기 위하여, 미주신경을 전기자극기를 이용하여 자극했을 때, 대동맥의 맥압과 관류량은 별다른 변화가 관찰되지 않았지만 심박수에 있어서는 대조군의 270.00 ± 14.03 beats/min에 비해 자극시 193.50 ± 28.43 beats/min으로 현저하게 감소되었다($p < 0.01$). ANP의 유리현상은 미주신경의 전기자극으로 0.11 \pm 0.02 ng/ml에서 약 0.20 ng/ml로, 그리고 1.27 \pm 0.18 ng/min에서 약 2.2 ng/min으로 농도와 분당 유리량이 모두 대조군에 비해 약 2배 정도 증가한 결과를 얻었다(Fig. 7).

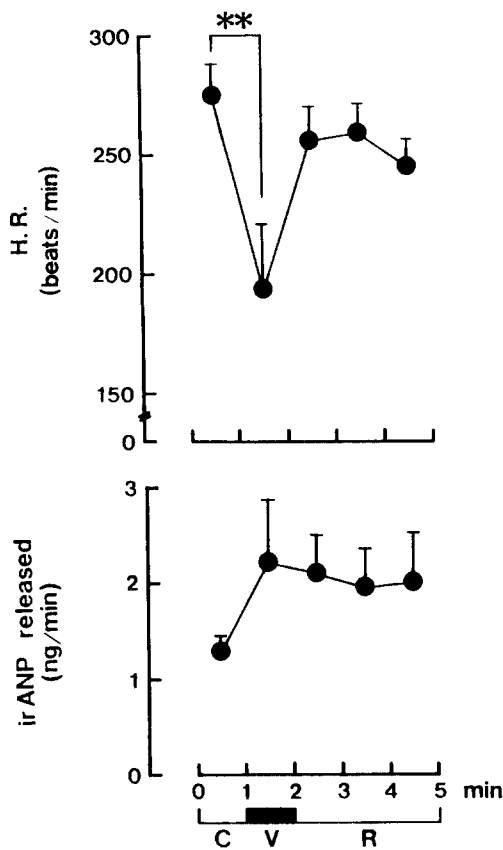


Fig. 7. The response to vagal stimulation in isolated perfused rat heart. Values are means from eight hearts of levels of heart rate (H.R.) and atrial natriuretic peptide. V, right vagus nerve stimulation. Other legends are the same as in Fig. 2.

고 찰

1. 심방의 용량부하에 의한 ANP의 유리

오래 전부터 마취 또는 무마취 동물에서 심방의 확장이 이노와 sodium배설의 항진현상과 상호관련성이 있음이 보고되어 (Henry *et al.*, 1956; Gauer *et al.*, 1961) 세포외액량의 조절에 있어서 심방이 어떤 중요한 역할을 하리라고 기대되었다. 그래서 이노와 sodium의 배설을 강력하게 항진시키는 것으로 알려진 ANP의 유리가 만일 심방의 확장으로 촉진된다면 체액의 조절현상을 이해하는데 있어 또 하나의 중요한 요인이 될 수 있

을 것이다.

ANP유리에 대한 기전은 아직 확실히 알려져 있지 않으나 심방의 확장에 의하여 유도됨이 많은 보고에서 밝혀지고 있다(Dietz, 1984; Lang *et al.*, 1985). Ledsome등(1985, 1986)은 승모판 협착에 의해 우심방의 압력을 증가시켰을 때 ANP의 유리가 촉진되는 것을 관찰하였는데, 이들은 대퇴동맥에서 얻은 혈액에서 보다는 관상정맥동에서 얻은 혈액내의 ANP농도가 높게 측정되어 ANP유리의 기원이 심장이라고 주장하였다. 또한 이들은 승모판을 협착시킨 실험동물에서 양측 미주신경을 절단하고 atenolol을 주입할 때는 ANP유리량의 증가를 차단하지못함을 관찰하여, ANP유리가 심방수용체의 자극이나 원심성 미주신경 혹은 교감신경의 반사활성화 보다는 심장벽의 직접적인 확장에 의해서 일어난다고 주장하였다. 이것은 다른 실험모형에서도 관찰되었다. 즉 체외 실험에서도 central venous pressure를 증가시키거나(Dietz, 1984), 관류량을 상대정맥을 통하여 우심방내로 과량 주입한 경우(Lang *et al.*, 1985; Ruskoaho *et al.*, 1986), 또는 심장의 preload나 afterload를 증가시켜 심방내압을 증가시켰을 때 (Onwochei *et al.*, 1987)에도 ANP의 유리가 촉진되었다. 그리고 심방조직에 tension을 주었을 때에도 주어진 tension의 크기에 비례하여 ANP의 유리량이 증가되었다(Schiebinger and Linden, 1986b). 이때 ANP의 유리는 용량이 증가될 때 매우 신속하게 나타나는데, 이들은 심방의 확장으로 심방근 섬유에 존재하는 긴장수용체가 흥분되어 심방세포내 ANP과립의 exocytosis가 증가되기 때문에 그 유리가 촉진되는 것으로 설명되고 있다.

본 연구에서는 우심방의 용량을 증가시켰을 때 심박수가 증가했다. 이것은 중추신경의 지배를 제거한 심장에 있어서 용량의 부하에 따라 심박수를 변화시키는 어떤 내재능력(Onwochei *et al.*, 1987)에 의한 것이라 생각된다. 그리고 400 μ l의 용량 부하시 관류량은 현저하게 감소되었는데, 이것은 우심방내에 들어있는 풍선이 팽창하여 우심방 내면에 너무 밀착되기 때문에 관류액의 순환이 저해를 받은 결과가 아닌가 사료된다. ANP의

유리에 있어서, 우심방내에 50 μ l와 100 μ l의 용량을 부하했을 때에는 심방의 확장기에 ANP의 유리량이 증가되어 다른 연구자들의 보고와 유사한 양상을 보였다. 그러나 200 μ l와 400 μ l의 과용량을 부하했을 때에는 심방의 확장기보다 회복기에 ANP의 유리가 현저하게 증가됨이 관찰되었다. 특히 400 μ l의 용량 부하시에는 확장기만에 오히려 ANP의 유리가 감소되었고, 반대로 회복기에는 ANP의 유리량이 엄청나게 증가되었다. 이것은 종전까지의 보고들과는 매우 상이한 흥미로운 결과라고 생각된다. 정상 흰쥐의 우심방 용적이 얼마인지는 알 수 없으나 최소한 200 μ l 이상은 생리적인 용적이 아니라고 생각된다. 200 μ l 이상의 과용량이 부하되었을 때는 심방이 확장을 했다가 수축하려 할 때 그곳에 내장된 고부푼선의 저해로 정상적인 회복이 어려운 것 같다. 즉 심방근의 길이가 정상적인 심방확장기 상태 이상으로 늘어났을 경우, 완전한 수축기상태로의 심방근의 환원이 되지 않아서 ANP의 유리가 중지되고 있다가 용량부하가 제거되어 심방근이 충분히 수축(환원)되자 ANP가 다시 순식간에 많이 쏟아져 나오는 것이 아닌가 생각된다. 이러한 현상은 토끼의 심방을 사용한 관류모형에서도 관찰되었다(Cho *et al.*, 1988). 즉 토끼에서도 심방이 확장되었을 때 보다는 다시 수축되었을 때 ANP의 유리량이 증가되었다. 따라서 심방의 신장 수용체의 흥분으로 발생하는 ANP유리의 촉진현상은 심방근이 확장할 때 일어나는 것이 아니라 심방근이 다시 원상으로 회복할 때 일어나는 것으로 사료된다.

2. Adrenergic receptor의 자극에 의한 ANP의 유리

ANP의 유리기전을 설명하는데 있어, 선행 연구자들은 신장수용체를 경유하는 것 외에 자율신경의 관련성에 대하여 많은 관심을 보여왔다. 특히 ANP의 유리에 대한 adrenergic조절이 많이 논의되고 있는데, 체외실험 모형에서 α -adrenergic 수용체의 자극제인 phenylephrine과 β -adrenergic 수용체의 자극제인 isoproterenol에 의해 ANP의 유리가 촉진되기 때문에 ANP의 유리기작에는 α -와 β -adrenergic수용체가 모두 관여한

다는 주장이 있다(Schiebinger and Linden, 1986). 그러나 다른 연구자들은 isoproterenol에 의해서는 ANP의 유리에 영향이 없다고하는 보고도 있다(Sonnenberg and Veress, 1984; Currie and Newman, 1986; Schiebinger, 1987). 또한 Gibbs(1987)와 Rankin등(1987a)은 오히려 β -adrenergic수용체의 자극에 의해 ANP의 유리가 촉진되었다고 주장하고 있다. 그밖에도 ANP의 유리기작에는 α -나 β -adrenergic수용체가 모두 무관하다는 보고(Garcia *et al.*, 1986; Hattori *et al.*, 1986)도 있어 논란의 여지가 매우 많은 것으로 생각된다.

자율신경의 지배에 의한 ANP의 유리기작을 알아보기 위해서는 생체내 실험보다 중추신경 및 말초신경의 영향을 제거한 체외실험이 더욱 효과적인 실험방법이라 생각된다. 본 실험에서도 적출심장의 관류모형을 사용하여 adrenergic수용체를 자극하는 약물들을 직접 심장에 주입하였다. Epinephrine을 주입하였을 때 ANP의 유리가 epinephrine의 농도에 비례해서 증가되었다. 이때 심장의 혈류동력학적 기능에 있어서도 변화가 관찰되었다. Epinephrine에 의해 심실근의 수축력이 향진되어 대동맥의 맥압이 상승되었으며, 심박수도 증가되었다. 그러나 관관류량은 관상혈관의 수축에 의해 감소되는 양상을 보였다(Goodman and Gilman, 1980). Epinephrine은 α -와 β -adrenergic수용체를 모두 자극할 수 있기 때문에, α -나 β -adrenergic수용체를 각각 특이하게 자극하는 약물을 심장에 주입하였다. Phenylephrine을 주입했을 때 ANP의 유리량은 대조군에 비해서 약 2배 가량 증가되었다. 또한 심장의 기능에 있어서도, 대동맥의 압력이 증가했으며, 우심방 내압과 심박수도 증가하였다. 그러나 관관류량은 유의하게 감소하였다. 이제까지는 심장에는 주로 β -adrenergic수용체가 지배적으로 작용한다고 알려져 있었으나, 최근 많은 연구자들에 의해 심장에도 α -adrenergic수용체가 작용하고 있다고 보고되었다(Murry and Vatner, 1979; Hattori and Kanno, 1982; Maisel *et al.*, 1987). 따라서 본 연구에서 얻어진 심장기능의 변화는 phenylephrine의 주입으로 심장내에 존재하는 α -adrenergic수용체가 흥분하기 때문이라 생

작된다. 한편 isoproterenol을 주입했을 때는 오히려 ANP의 유리가 억제되었다. 이때의 심장기능으로서는 대동맥압과 우심방의 내압이 증가되었으며, 심박수와 관류량도 증가되었다. 그런데 우심방 내압의 증가에 따라 ANP의 유리량이 증가된다는 주장(Lang *et al.*, 1985; Ruskoaho *et al.*, 1986)과 심박수의 증가로도 ANP유리량이 증가된다는 관점(Rankin *et al.*, 1986)에서 본다면, isoproterenol의 주입으로 우심방의 내압과 심박수가 현저하게 증가했음에도 불구하고 ANP의 유리량은 증가되지 않았다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 ANP의 유리는 심방의 물리적인 변화나 심박수의 변화와는 반드시 연관되지 않는다는 점을 시사하고 있다. 또 연구자들 간에 논란이 되고 있는 adrenergic수용체의 관련성에 있어서도 본 연구에서는 ANP의 유리와 α -adrenergic수용체의 관련성이 크다는 것을 보여주고 있다.

3. 미주신경의 흥분에 의한 ANP의 유리

교감신경을 자극했을 때(Ledsome *et al.*, 1986; Rankin *et al.*, 1987b)와 부교감신경을 자극했을 때(Rankin *et al.*, 1987b), 현저한 심박수의 증감과 심방내압의 변화에도 불구하고 ANP의 유리량에는 아무런 변화가 없었다고 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 흰쥐의 적출심장의 관류모형에서 우측 미주신경을 전기자극하였을 때 심박수의 현저한 감소현상에도 불구하고 ANP의 유리량이 대조군에 비해 약 2배 정도 증가됨이 관찰되었다.

Sonnenberg등(1984)의 보고에 의하면, 흰쥐의 심방조직을 배양한 배양액내에 acetylcholine을 첨가했을 때 ANP의 유리량이 증가하였다. 이들은 이러한 증가현상이 acetylcholine의 작용을 특이하게 차단하는 약물인 atropine에 의해 억제됨을 관찰하여 ANP의 유리기작에 muscarinic수용체가 관여하고 있다고 주장하였는데, 이것은 다른 연구자들에 의해서도 확인되었다(Toth *et al.*, 1986; Naruse *et al.*, 1986).

이러한 선행 연구자들의 논의 내용을 감안할 때 본 연구결과는 미주신경을 자극할 때 그 신경의 말단에서 유리된 acetylcholine에 의해 심방세포에 존재하는 muscarinic수용체가 활성화되어

ANP의 유리량이 증가된 것으로 사료된다.

인용문헌

- Agnoletti, G., A. Rodella, R. Ferrari, and P. Harris, 1987. Release of atrial natriuretic peptide — like immunoreactive material during stretching of the rat atrium *in vitro* *J. Mol. Cell. Cardio.* **19**: 217-220.
- Atarashi, K., P. J. Mulrow, R. France — Saenz, R. Snajdan, and J. Rapp, 1984. Inhibition of aldosterone production by an atrial extract. *Science* **224**: 992-994.
- Bilder, G. E., T. L. Schofield, and E. H. Blaine, 1986. Release of atrial natriuretic factor. Effects of repetitive stretch and temperature. *Am. J. Physiol.* **251**: F817-F821.
- Burnett, J. C., J. P. Granger, and T. J. Opgenorth, 1984. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am. J. Physiol.* **247**: F863-F866.
- Cho, K. W., K. H. Seul, S. H. Kim, H. Ryu, K. M. Seul, and G. Y. Koh, 1988. Epicardial release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in inside — out perfused rabbit atria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 811-817.
- Choi, J. B., I. K. Song, J. S. Lee, S. H. Choi, and Y. H. Moon, 1988. Effect of topical hypothermia on myocardial protection from ischemia. — Experimental study using isolated rat heart perfusion technique — *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **21**: 231-239.
- Curie M. G. and W. H. Newman, 1986. Evidence for α -1 adrenergic receptor regulation of atriopeptin release from the isolated rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 94-100.
- Dietz, J. R., 1984. Release of natriuretic factor from rat heart — lung preparation by atrial distension. *Am. J. Physiol.* **247**: R1093-R1096.
- Dietz, J. R., 1987. Control of atrial natriuretic factor release from a rat heart — lung preparation. *Am. J. Physiol.* **252**: R498-R502.
- Edward, B. S., R. S. Zimmerman, T. R. Schwab, D. M. Heublein, and J. C. Burnett Jr., 1988. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ. Res.* **62**: 191-195.
- Freeman, R. H., J. O. Davis, and R. C. Vari, 1985. Renal response to atrial natriuretic factor in conscious dogs with caval constriction. *Am. J. Physiol.* **248**: R495-R500.
- Garcia, R., G. Thibault, M. Cantin, and J. Genest, 1984. Effect of purified atrial natriuretic factor on rat and

- rabbit vascular strips and vascular beds. *Am. J. Physiol.* **247**: R34-R39.
- Garcia, R., D. Lachance, G. Thibault, J. Gutkowska, and M. Cantin, 1986. Mechanisms of release of atrial natriuretic factor (ANF) in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8**: 1311.
- Garcia, R., M. Cantin, and G. Thibault, 1987. Role of right and left atria in natriuresis and atrial natriuretic factor during blood volume changes in the conscious rat. *Circ. Res.* **61**: 99-106.
- Gauer, O. H., J. P. Henry, and H. O. Sieker, 1961. Cardiac receptors and fluid volume control. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **4**: 85-90.
- Gibbs, D. M., 1987. β -Adrenergic control of atrial natriuretic factor secretion from dispersed rat atrial myocytes. *Regul. Peptides.* **19**: 73-78.
- Goodfriend, T. L., M. E. Elliott, and S. A. Atlas, 1984. Actions of synthetic atrial natriuretic factor on bovine adrenal glomerulosa. *Life Sci.* **35**: 1675-1682.
- Goodman, A. and A. Gilman, 1980. Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. MacMillan, New York. p. 138-175.
- Hattori, Y. and M. Kanno, 1982. Differential influences of several α -adrenoceptor antagonists on α -adrenoceptor-mediated inotropic responses in the left atria of guinea pigs. *JPN J. Pharmacol.* **32**: 359-368.
- Hattori, T., K. Hashimoto, H. Inoue, M. Sugawara, S. Suemaru, K. Takao, J. Kageyama, and Z. Ota, 1986. Effect of α - and β -adrenergic agonist and antagonists on atrial natriuretic peptide secretion *in vitro*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8**: 1306.
- Henry, J. P., O. H. Gauer, and J. L. Reeves, 1956. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ. Res.* **4**: 85-90.
- Huang, C. L., J. Lewicki, L. K. Johnson, and M. G. Cogan, 1985. Renal mechanism of action of rat atrial natriuretic factor. *J. Clin. Invest.* **75**: 769-773.
- Lang, R. E., H. Tholken, D. Ganten, F. C. Luft, H. Ruskoaho, and Th. Unger, 1985. Atrial natriuretic factor — a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* **314**: 264-266.
- Ledsome, J. R., N. Wilson, C. A. Courneya, and A. J. Rankin, 1985. Release of atrial natriuretic peptide by atrial distension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**: 739-742.
- Ledsome, J. R., N. Wilson, A. J. Rankin, and C. A. Courneya, 1986. Time course of release of atrial natriuretic peptide in the anaesthetized dog. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 1017-1022.
- Lee, J. K., and K. W. Cho, 1986. Effect of atrial natriuretic factor on the renal function and renin release in unanesthetized rabbit. *Kor. J. Physiol.* **20**: 103-124.
- Maack, T., D. N. Marion, M. J. F. Camargo, H. D. Kleinert, J. H. Laragh, E. D. Vaughan, and S. A. Atlas, 1984. Effects of auriculin (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am. J. Med.* **77**: 1069-1075.
- Maisel, A. S., H. J. Motulsky, and P. A. Insel, 1987. Life cycles of cardiac α 1- and β -adrenergic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 1-6.
- Murray, P. A. and S. F. Vatner, 1979. α -Adrenoceptor attenuation of the coronary vascular response to severe exercise in the conscious dog. *Circ. Res.* **45**: 654-660.
- Napier, M. A., R. L. Vanden, G. Albers — Schonberg, R. F. Nutt, S. Brady, T. Lyle, R. Winquist, E. P. Faison, L. A. Heinel, and E. H. Blaine, 1984. Specific membrane receptors for atrial natriuretic factor in renal and vascular tissues. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 5946.
- Naruse, K., M. Naruse, K. Obana, A. B. Brown, T. Shibasaki, H. Demura, K. Shizume, and T. Inagami, 1986. Right and left atrium share a similar mode of secreting atrial natriuretic factor *in vitro* in rats. *J. Hypertension* **4**: S497-S499.
- Ohlstein, E. H. and B. A. Berkowitz, 1985. Cyclic guanosine monophosphate mediates vascular relaxation induced by atrial natriuretic factor. *Hypertension* **7**: 396-410.
- Onwochei, M. O., R. M. Snajdar, and J. P. Rapp, 1987. Release of atrial natriuretic factor from heart — lung preparations of inbred Dahl rats. *Am. J. Physiol.* **253**: H1044-H1052.
- Paganelli, W. C., J. R. Cant, R. R. Pintal, I. Kifor, A. C. Barger, and V. J. Dzau, 1988. Plasma atrial natriuretic factor during chronic thoracic inferior vena caval constriction. *Circ. Res.* **62**: 279-285.
- Rankin, A. J., C. A. Courneya, N. Wilson, and J. R. Ledsoome, 1986. Tachycardia releases atrial natriuretic peptide in the anesthetized rabbit. *Life Sci.* **38**: 1951-1957.
- Rankin, A. J., N. Wilson, and J. R. Ledsoome, 1987a. Effects of autonomic stimulation on plasma immunoreactive atrial natriuretic peptide in the anesthetized rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 532-537.
- Rankin, A. J., N. Wilson, and J. R. Ledsoome, 1987b. Influence of isoproterenol on plasma immunoreactive atrial natriuretic peptide and plasma vasopressin in the anesthetized rabbit. *Pflügers Arch.* **408**: 124-128.
- Ruskoaho, H., M. Toth, and R. F. Lang, 1985. Atrial natriuretic peptide secretion: Synergistic effect of phorbol ester and A23187. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **133**: 581-588.
- Ruskoaho, H., H. Tholken, and R. E. Lang, 1986. Increase in atrial pressure releases atrial natriuretic pep-

- tide from isolated perfused rat hearts. *Pflügers Arch.* **407**: 170-174.
- Schiedbinger, R. J. and J. Linden, 1986a. α - and β -adrenergic agonists directly and distinctively influence atrial natriuretic peptide (ANP) secretion. *Hypertension* **8**: 825.
- Schiedbinger, R. J. and J. Linden, 1986b. The influence of resting tension on immunoreactive atrial natriuretic peptide secretion by rat atria superfused *in vitro*. *Circ. Res.* **59**: 105-109.
- Schiedbinger, R. J., 1987. Mechanism of muscarinic agonist inhibition of norepinephrine stimulated atrial natriuretic peptide (ANP) secretion. *J. Mol. Cell Cardiol.* **19**: S46.
- Schiffman, E. L., J. Gutkowska, O. Kuchei, M. Cantin, and J. Genest, 1985. Plasma concentration of atrial natriuretic factor in a patient with paroxysmal atrial tachycardia. *New Eng. J. Med.* **312**: 1196-1197.
- Snedecor, G. H. and W. G. Cochran, 1967. Statistical methods. 6th ed. Ames. Iowa State Univ.
- Sonnenberg, H. and A. T. Veress, 1984. Cellular mechanism of release of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **124**: 443-449.
- Sonnenberg, H., R. F. Krebs, and A. T. Veress, 1984. Release of atrial natriuretic factor from incubated rat heart atria. *IRCS Med. Sci.*, **12**: 783-784.
- Toth, M., H. Ruskoaho, and R. E. Lang, 1986. Regulation of atrial natriuretic peptide secretion. *J. Hypertension* **4**: S538-S541.
- Yamaji, T., M. Ishibashi, H. Nakaoka, K. Imataka, M. Amano, and J. Fujii, 1985. Possible role for atrial natriuretic peptide in polyuria associated with paroxysmal atrial arrhythmias. *Lancet* **I**: 1211.

(Accepted September 22, 1990)

Influence of Some Factors on the Secretion of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in the Isolated Rat Heart

Sung Zoo Kim, Geum Yeong Lee, and Kyung Woo Cho* (Department of Biology, College of Natural Sciences; *Department of Physiology, Medical School, Chonbuk National University, Chonju, 560-756, Korea)

To elucidate the mechanism involved in the secretion of atrial natriuretic peptide, the effects of atrial distension, some adrenergic stimulators, and vagal stimulation on atrial natriuretic peptide secretion were studied in the isolated perfused rat heart preparation.

The effect of continuous and repetitive mechanical stretch on the secretion of atrial natriuretic peptide was examined in atria distended by inflation of miniature balloon catheter. The secretory responses of isolated perfused hearts to epinephrine, phenylephrine, and isoproterenol were studied, also the right vagus nerve was stimulated in the isolated nerve-heart preparations. Results were summarized as follows:

1. The concentration of atrial natriuretic peptide in the perfusates increased in proportion to the degree of volume loading. In overvolume loading, the secretion of atrial natriuretic peptide at the reduction of distension was about two — to ten — fold greater than at the expansion.
2. The secretion of atrial natriuretic peptide was increased by administration of epinephrine and phenylephrine (α -adrenergic stimulator). The response to epinephrine was shown to be dose — dependent fashion. In spite of the increases of heart rate and right atrial pulse pressure, the secretion of atrial natriuretic peptide to isoproterenol (β -adrenergic stimulator) was slightly reduced.
3. Although heart rate was significantly reduced by electrical stimulation of right vagus nerve, the secretion of atrial natriuretic peptide was increased.

These results suggest that the secretion of atrial natriuretic peptide from the heart does not occur at relaxation of atrial muscle but at contraction. And the α -adrenergic receptor might participate in the regulation of atrial natriuretic peptide secretion. Also the change of heart rate and atrial pressure does not directly relate with the secretion of atrial natriuretic peptide. And also additionally vagus nerve might participate in the mechanism of secretion of atrial natriuretic peptide.