

허혈성 전처치와 당원 결핍과의 관계

장 대 영* · 김 대 중** · 원 경 준*** · 조 대 윤*** · 손 동 섭***
양 기 민*** · 라 봉 진* · 김 호 덕****

=Abstract=

Ischemic Preconditioning and Its Relation to Glycogen Depletion

Dae-Yung Chang, M.D.*, Dae-Joong Kim, M.D.**, Kyung Joon Won, M.D.***,
Dai Yun Cho, M.D.***, Dong Suep Sohn, M.D.***, Ki-Min Yang, M.D.***,
Bong-Jin Rah, M.D.*, Ho-Dirk Kim, M.D.****

Background: Recent studies have suggested that the cardioprotective effect of ischemic preconditioning(IP) is closely related to glycogen depletion and attenuation of intracellular acidosis. In the present study, the authors tested this hypothesis by perfusion isolated rabbit hearts with glucose(G)-free perfusate. **Material and Method:** Hearts isolated from 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 min global ischemia followed by 120 min reperfusion with IP(IP group, n=13) or without IP(ischemic control group, n=10). IP was induced by single episode of 5 min global ischemia and 10 min reperfusion. In the G-free preconditioned group(n=12), G depletion was induced by perfusion with G-free Tyrode solution for 5 min and then perfused with G-containing Tyrode solution for 10 min; and 45 min ischemia and 120 min reperfusion. Left ventricular function including developed pressure(LVDP), dP/dt, heart rate, left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP) and coronary flow(CF) were measured. Myocardial cytosolic and membrane PKC activities were measured by ^{32}P - γ -ATP incorporation into PKC-specific peptide and PKC isozymes were analyzed by Western blot with monoclonal antibodies. Infarct size was determined by staining with TTC(tetrazolium salt) and planimetry. Data were analyzed by one-way analysis of variance(ANOVA) and Turkey's post-hoc test. **Result:** In comparison with the ischemic control group, IP significantly enhanced functional recovery of the left ventricle; in contrast, functional recovery were not significantly different between the G-free preconditioned and the ischemic

*중앙대학교 의과대학 조직학교실

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

**강원대학교 의과대학 해부학교실

Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University

***중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실

Departments of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University

****성균관대학교 의과대학 해부학교실

Department of Anatomy, School of Medicine, Sungkyunkwan University

†본 연구의 일부는 1999년도 중앙대학교 교내연구비로 이루어짐.

논문접수일 : 2000년 4월 21일 심사통과일 : 2000년 6월 16일

책임저자 : 조대윤(140-757) 서울 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대 부속 용산병원 흉부외과. (Tel) 02-748-9566, (Fax) 02-794-4319

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

control groups. However, the infarct size was significantly reduced by IP or G-free preconditioning(39±2.7% in the ischemic control, 19±1.2% in the IP, and 15±3.9% in the G-free preconditioned, p<0.05). Membrane PKC activities were increased significantly after IP (119%), IP and 45 min ischemia(145%), G-free preconditioning(150%), and G-free preconditioning and 45 min ischemia(127%); expression of membrane PKC isozymes, α and ϵ , tended to be increased after IP or G-free preconditioning. **Conclusion:** These results suggest that in isolated Langendorff-perfused rabbit heart model, G-free preconditioning (induced by single episode of 5 min G depletion and 10 min repletion) could not improve post-ischemic contractile dysfunction(after 45-minute global ischemia); however, it has an infarct size-limiting effect.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:531-40)

Key Word: 1. Preconditioning
2. Myocardial protection
3. Glucose

서 론

1980년대 중반까지만 하더라도 심장 연구자들은 한번 허혈 손상을 받은 후 다시 허혈에 빠지는 경우 심근세포는 허혈 회수에 비례하여 고에너지 인산 고갈이나 유산(lactic acid)의 세포내 축적 증가로 보다 더 빨리 경색에 이르게 되는 것으로 생각하였다¹⁾. 그러나 Reimer 등은²⁾ 허혈 회수가 증가하더라도 고에너지 인산 고갈이나 유산의 세포내 축적은 관계없음을 관찰하였고 이러한 생각들은 Murry 등의³⁾ 개를 이용한 실험으로 오류임이 규명되었다. 이들은 짧은 기간 동안 허혈과 재관류를 반복할 경우 심근은 후속 되는 보다 긴 기간 동안의 허혈에 대하여 심근경색 범위가 한정되거나 감소하는 등의 보호 효과가 있음을 관찰하고 이와 같은 역설적인 심근보호 현상을 허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IP)라고 명명하였다. IP를 실시하면 심근경색 범위의 감소, 심근기능의 회복 증가, 재관류 유발성 부정맥 발생빈도 감소 등의 보호 효과들이 나타난 동물실험을 통해 증명되고 있다⁴⁻⁹⁾. IP의 중요성을 한마디로 요약하기는 어렵지만 심근세포내에 존재하는 자기보호 기전으로부터 허혈에 대항한다는 점에 있기 때문에 IP의 유도 방법이나 IP 효과의 발생기전에 대한 지식은 허혈성 심장병 치료약물 개발 뿐 아니라 개심술에도 적용할 수 있으므로 심장 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다. IP의 발생기전에 대하여는 아데노신 수용기 자극¹⁰⁾, KATP channel 활성화¹¹⁾, protein kinase C(PKC) 전이^{12,13)}, 당원고갈^{14,15)} 등이 제시되고 있으나 논란이 많다.

IP를 유도할 때 짧은 기간 동안의 허혈 상태에서는 당원고갈로 후속되는 보다 긴 기간 동안의 허혈중 심근세포내 당원은 현저히 저하되어 결과적으로 세포내 산증(acidosis) 발생을 지연시키거나 약화시킴으로서 재관류시 경색범위, 심근기

능의 회복 등이 나타나는 것으로 추측하고 있다. 당원(glycogen)은 여러 개의 glucose분자로 이루어진 것으로 심근 세포 세포질에서 흔히 볼 수 있는 포함물이다. 심장에서는 외부로부터 glucose의 공급이 중단되면 세포질내에 축적되어 있던 당원이 인산화된 형태로 분해되면서 심근수축에 필요한 에너지(ATP) 생산원으로서의 역할을 한다. Henning 등에¹⁶⁾ 따르면 외인성 glucose중 20%만이 당분해과정에서 산화되는 반면 심근세포내에 저장되어 있던 당원으로부터 나온 glucose는 50% 이상이 당분해과정에서 산화되며 적출 심장을 이용한 실험에서는 적어도 총 ATP 생산량의 41% 정도가 심근세포 세포질 내에 저장되었던 당원으로부터 생산된다고 한다. 또한 허혈시에는 혐기성 당분해의 증가로 심근세포내 당원 pool의 고갈과 함께 당분해의 최종 대사산물인 유산이 심근세포내에 축적되어 세포기능 저하와 형태학적인 변화가 일어나는 것으로 알려지고 있다.

이상으로 저자들은 glucose를 포함하지 않은 용액으로 짧은 기간 관류하면 이는 IP와 같은 조건에 놓이게 될 것이므로 세포내 신호전달 체계의 일부분인 protein kinase C(PKC)와 관련된 발생기전으로서의 가능성을 탐색하기 위하여 본 실험을 시도하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 심장적출

복합사료와 물을 제한 없이 주어 사육한 체중 1.5~2.0 kg의 흰토끼(New Zealand White rabbit, n=65)를 실험동물로 사용하였으며, 모든 동물실험은 미국생리학회 추천하는 실험동물 사용지침(Guidelines of the Use of Laboratory Animals, American Physiology Society, 1985)에 따라 실시하였다. 심장

을 적출하여 Langendorff 관류장치(Size 5, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany)에 고정하여 non-recirculating Langendorff 방법에 따라 산소로 포화된 Tyrode 용액(containing in mM: NaCl 140.0, KCl 4.4, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0; pH 7.4)으로 관류하였다. 실험중 심장을 매다는 방(water-jacketed heat chamber)의 온도는 37°C, 관류압과 관류량은 각각 60 mmHg, 35 ml/min으로 유지하였고, 전기 자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)로 1분 동안 심박동수가 150회가 유지되도록 조정하고(4.0 V, 0.5 msec interval) 30~50분 동안 관류하여 심장기능이 일정하게 유지되면 이 때를 모든 실험의 기준점으로 하였다.

2. 실험 원안(protocol)

실험 원안은 Fig. 1. 과 같다. 적출 심장에서 기준선 값이 유지되면 임의로 선택하여 아래와 같이 실험을 실시하였다.

허혈대조군(n=10)에서는 45분 동안 허혈 후 120분 동안 재관류하였다. IP군(n=13)에서는 5분 허혈, 10분 재관류를 한번 실시하여 IP를 유도하고 45분 동안 허혈 실시 후 120분 동안 재관류하였다. Glucose결핍용액 투여 전처치군(n=12)에서는 glucose가 포함되지 않은 관류액으로 5분 동안 관류하고 glucose를 포함한 관류액으로 10분 동안 관류한 후 45분 동안 허혈 후 120분 동안 재관류하였다.

PKC활성도 변화를 보기 위하여 허혈이나 IP 등의 처치를 하지 않은 실험군(baseline), 45분 동안 허혈만 실시한 실험군 (I), IP만 실시한 실험군(IP), IP후 45분 동안 허혈실시 실험군 (IP+I), glucose 결핍용액 투여 전처치만 실시한 실험군(G(-)), glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안 허혈실시 실험군 (G(-)+I) 등을 각각(n=5 each) 추가하였다.

본 실험에 사용된 시약은 모두 Sigma Chemical Company (St. Louis, Ma, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다.

50분 정도의 관류에도 불구하고 기준선 혈역학값이 일정하게 유지되지 않거나 재관류시 부정맥 등이 현저히 증가하여 나타나는 경우에는 모두 관찰대상으로부터 제외하였다.

3. 좌심실 기능 및 관혈류(coronary flow)의 측정

각 실험에서 Tyrode 용액으로 관류하여 일정한 상태가 유지되면 폐정맥을 통하여 좌심실에 고무풍선을 삽입하고 압력전달 장치(Havard 50-8952, Ma., U.S.A)에 연결하였다. 고무 풍선에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 8~10 mmHg가 되도록 조정 한 후 좌심실압(left ventricular developed pressure, LVDP), 심근수축력(+dp/dt), 심박동수 등을 기록하였다. 관류를 시작하여 심장기능이 일정하게 유지되면 관류액의 누출을 방지하

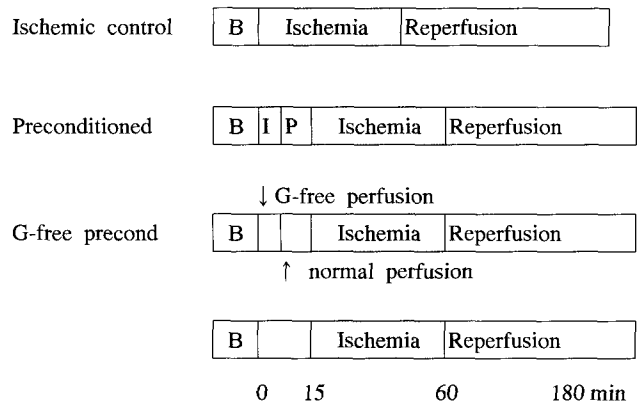


Fig 1. Schematic illustration of experimental protocol. In the glucose-free preconditioned(G-free precondition) group, hearts were subjected to perfusion with glucose-free Tyrode solution for 5 minutes and then with normal perfusate for 10 minutes prior to subsequent sustained ischemia. Abbreviations: B, baseline; IP, ischemic preconditioning.

기 위하여 폐정맥과 대정맥을 견봉합사로 결찰한 후 폐동맥을 통하여 우심실내로 카눌라를 삽관하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하여 단위시간 동안의 관혈류를 측정하였다. LVDP, 심근수축력, 관혈류 등의 회복율은 기준선 값을 100으로 하여 백분율로 표시하였다.

4. Protein kinase C활성도 측정

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 (ethylenediamine-tetraacetic acid), 1.0 mM EGTA(ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N'- tetraacetic acid), 10 mM β-mercaptoethanol(pH 7.4, 4°C)을 함유한 용액을 첨가하여 균질화한 후(Ultra-Turrax T-25, Germany) 4°C하에서 100,000 g로 1시간 동안 원심 분리하여 상청액을 세포질분획(cytosol fraction)으로 사용하였다. 침전물을 다시 위의 용액에 Triton X-100(0.3 vol%)을 첨가한 용액으로 녹여 4°C하에서 1 시간 동안 교반하고 원심 분리하여 상청액을 세포막분획(membrane fraction)으로 사용하였다. 각 분획의 활성도는 PKC assay system(Amersham RPN77)을 사용하여 측정하였다. 즉, 각각의 시료 10 μg을 0.2 μCi의 32P-γ-ATP(specific activity, 3,000 Ci/mmol/l, Amersham)와 함께 15분 동안 반응시킨 후 방사능(radioactivity)을 측정하여 PKC 활성도를 측정하였다. 이상의 방법을 각 시료당 3회 실시하여 평균을 취하였으며, 기준선의 PKC 활성도는 허혈이나 IP없이 관류 시작후 50분 동안 기준선의 혈역학 값이 일정하게 유지되게 하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 측정값은 모두 nmol/g tissue

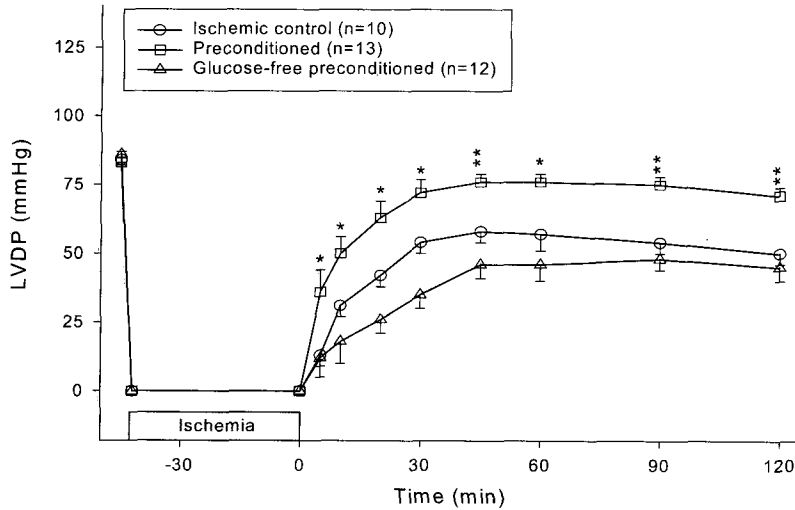


Fig 2. Changes of the left ventricular developed pressure (LVDP) during ischemia and reperfusion. *p<0.05, **p<0.01, ischemic control vs preconditioned.

로 표기하였다.

5. Protein kinase C 동종효소의 변화

각 실험군별로 좌심실 500 mg을 적출하여 SDS-sample buffer를 첨가한 후 균질화(3×30 sec, 10,000 rpm)하고 1시간 동안 원심하여(20,000 g, 4℃) 상청액을 전기영동 시료로 사용하였다. 각 군별로 추출된 단백질(50~100 μg)을 Laemmli (1970)의 방법에¹⁷⁾ 따라 25 mA에서 5시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질들을 polyvinylidene difluoride 막에 이적시켜 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위하여 5% skim milk를 함유하는 TBS-T(Tris-buffered saline/Tween 20: 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 실온에서 1시간 동안 처리한 후 각각의 일차항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 씻어준 후 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시키고 다시 씻어준 후 enhanced chemiluminescence kit(Amersham)를 이용하여 각각의 단백질 띠를 확인하였다. 이상과 같은 방법으로 각각 세 번씩 immunoblotting을 실시하여 PKC 동종효소중 다섯 가지(α, β, δ, ε 및 ζ)의 발현 및 변화 양상을 관찰하였다.

6. 좌심실의 경색크기 측정

각 실험 종료후 심장을 관류장치로부터 분리하여 실온에서 1% triphenyltetrazolium chloride(TTC, in phosphate buffer, pH 7.4)에 20분 동안 관류한 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정된 심장을 심저부와 평행한 방향으로 2 mm 간격으로 횡으로 절단한 후 심저부를 향하는 횡단면을 Kodak Ektachrome 필름(ISO 100)으로 사진 촬영하여 경색부위 측정에 사용하였다. 환등필름을 영사막에 투사하고 심실 중격을 포함하는 좌심실 횡단면(LV cross sectional area,

LVA)과 경색부위의 단면(infarcted area, IA)을 추적하여 종이 위에 복사한 후 구적계(X-Plan 360dII, Ushikata, Tokyo, Japan)를 이용하여 경색부위의 밀도(% IA/LVA)를 구하고 이를 경색크기로 하였다⁹⁾.

7. 통계처리

모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였다. 분산분석(analysis of variance)으로 처리하여 유의성이 있다고 판정되면 Turkey's post-hoc test를 이용하여 검정하였다. p값이 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 좌심실 기능 및 관혈류의 변화

기준선의 LVDP, +dP/dt, 심박동수, LVEDP 및 관혈류량은 허혈 대조군에서 각각 84±2 mmHg, 1040±15 mmHg/sec, 150±0 bpm(beats/min), 9±1 mmHg, 28.3±0.2 mL/min, 허혈성 전처치군에서 각각 83±4 mmHg, 1037±35 mmHg/sec, 150±0 bpm, 9±1 mmHg, 28.3±0.2 mL/min, glucose 결핍용액 투여 전처치군에서 각각 86±3 mmHg, 1120±38 mmHg/sec, 150±0 bpm, 10±0 mmHg, 29±0.3 mL/min으로 실험군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다.

LVDP는 모든 실험군에서 재관류 이후 증가하기 시작하여 45분 경부터 일정한 값을 유지하였으며, 특히 IP군에서는 20분에 기준선 값의 75% 이상 증가하여 30분 이후에는 거의 90% 이상을 유지, 허혈 대조군에 비하여 현저한 차이를 나타내었으나 glucose 결핍용액 투여 전처치군에서는 허혈 대조군과 비교하여 유의한 변화는 아니었으나 LVDP의 회복율은 대체로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). dP/dt 최대값

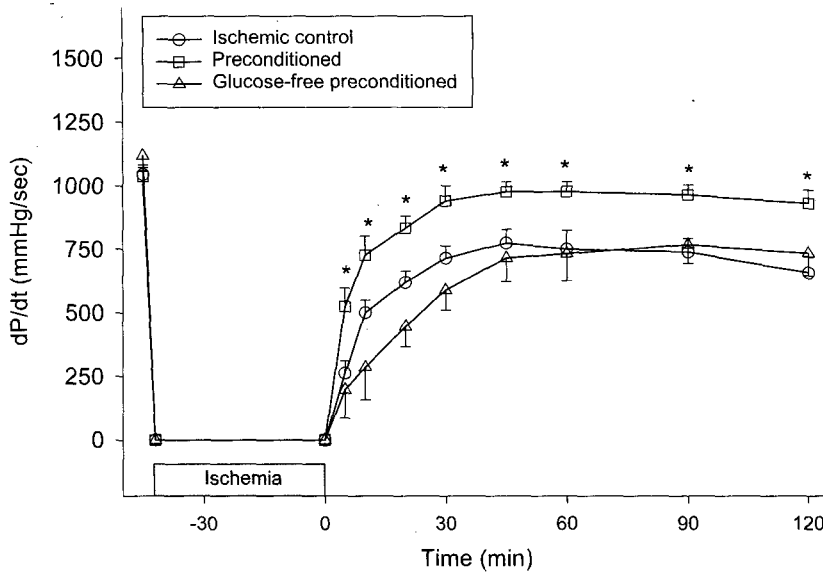


Fig 3. Changes of the maximal left ventricular contractility (dP/dt) during ischemic and reperfusion. * $p < 0.01$, ischemic control vs preconditioned.

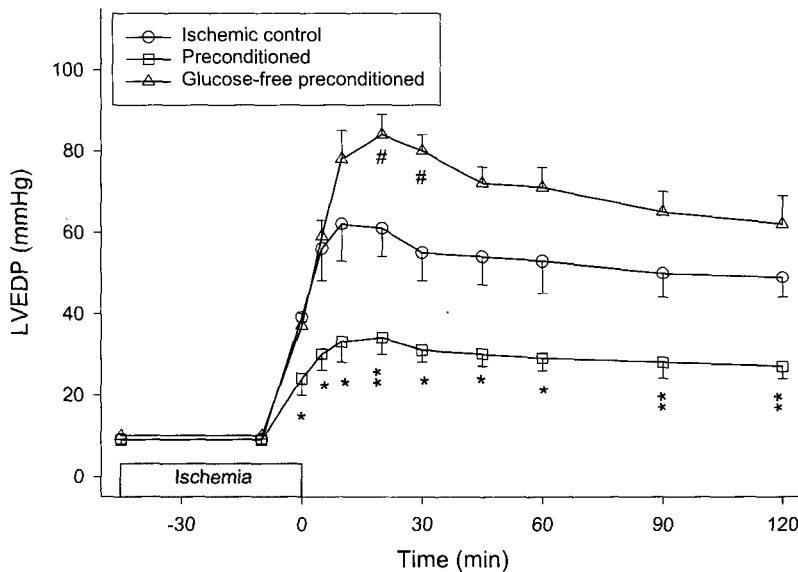


Fig 4. Changes of the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) during ischemia and reperfusion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ischemic control vs preconditioned; # $p < 0.05$, ischemic control vs glucose-free preconditioned.

은 모든 실험군에서 재관류를 시작함에 따라 증가하여 30분 경부터는 일정한 값을 유지하였으나 IP군에서는 재관류 45분 이후부터 거의 기준선 값에 가깝게 유지되어 허혈 대조군과 유의한 차이를 나타내었다(Fig. 3). Glucose 결핍용액 투여 전처치군에서는 허혈 대조군에 비하여 유의한 차이는 없었으나 LVDP 회복율과 같이 dP/dt 최대 값의 회복율도 재관류 초기에는 다소 저하되는 경향을 나타내었다. LVEDP의 상승폭은 허혈 대조군이나 glucose 결핍용액 투여 전처치군과 비교하여 IP군에서 현저히 낮았으며(Fig. 4) glucose 결핍용액 투여 전처치군에서는 재관류 시작후 45분 경까지 유의하게 증가하였으나 시간이 경과할수록 감소하여 재관류후 60분 이후에는 허혈 대조군과 차이가 없었다. 기준선에서의

관혈류량은 허혈 대조군, IP군, glucose 결핍용액 투여 전처치군에서 각각 28.2 ± 0.2 , 28.3 ± 0.2 , 28.0 ± 0.0 , 28.3 ± 0.3 mL/min으로 서로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 관혈류의 회복율은 재관류 시작후 급격히 증가하여 비교적 일정하게 유지되는 경향을 나타내었으며 실험군 사이에서 유의한 차이는 볼 수 없었다(Fig. 5).

2. Protein kinase C활성도 및 동종효소의 변화

기준선에서 세포질 및 세포막 분획의 PKC활성도는 각각 7.506 ± 0.08 , 1.066 ± 0.045 nmol/g tissue이었다. 45분 동안 허혈만을 실시한 실험군의 세포질 및 세포막 분획의 활성도는 각각 7.399 ± 0.055 , 0.932 ± 0.023 nmol/g tissue로 두 분획 모두

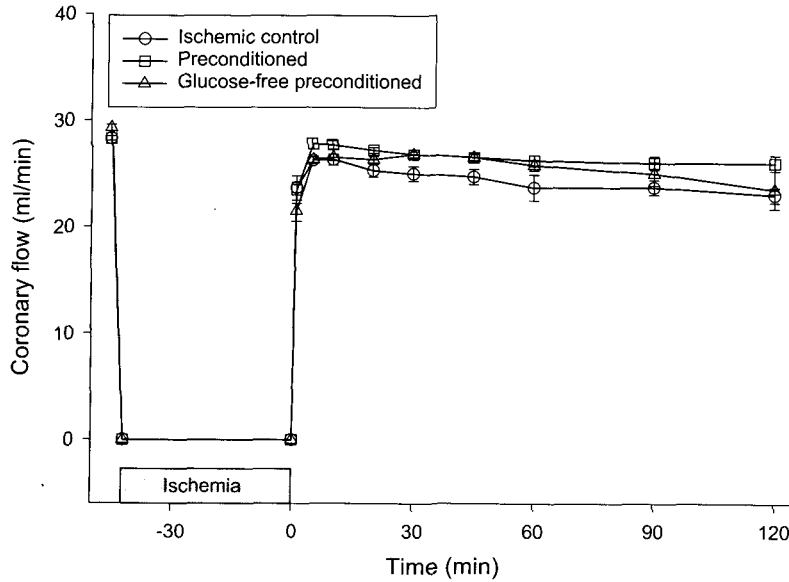


Fig 5. Changes of the coronary flow during ischemia and reperfusion.

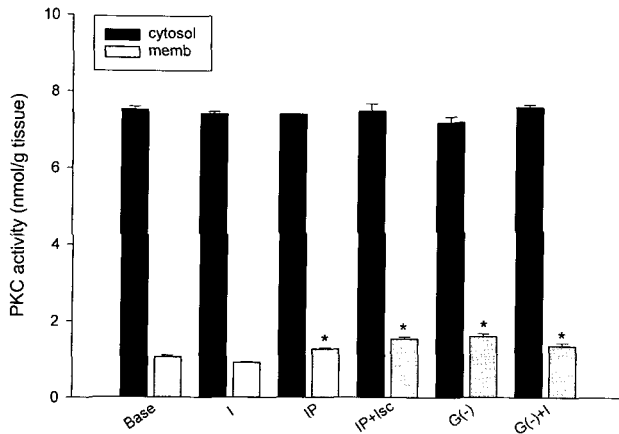


Fig 6. PKC activity. * $p < 0.01$, vs Base. Base; baseline, I; 45-min ischemia, IP; ischemic preconditioning, G(-); glucose-free preconditioning, Cyto; cytosol fraction, memb; membrane fraction.

기준선과 비교하여 차이를 나타내지 않았다. IP만을 실시한 실험군과 IP후 45분 동안 허혈을 실시한 실험군의 세포질 및 세포막 분획의 활성도는 각각 7.385 ± 0.200 , 1.269 ± 0.03 , 7.467 ± 0.194 , 1.542 ± 0.043 nmol/g tissue로 세포질 분획의 활성도는 기준선에 비하여 차이를 나타내지 않았으나 세포막 분획의 활성도는 현저히 증가하였다(Fig. 6). Glucose 결핍용액을 투여하여 전처치만 실시한 실험군과 glucose 결핍용액 투여후 45분 동안 허혈을 실시한 실험군의 세포질 및 세포막 분획의 활성도는 각각 7.171 ± 0.148 , 1.599 ± 0.0718 , 7.572 ± 0.065 , 1.350 ± 0.079 nmol/g tissue로 세포질 분획의 활성도는 기준선과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았으나 세포

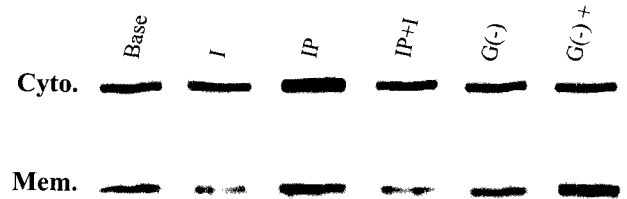


Fig 7. PKC isozymes α (upper lanes) and ϵ (lower lanes) determined by Western blot with monoclonal antibodies. ISC; after 45 min ischemia, IP; after ischemic preconditioning, IP+I; after IP and 45 min ischemia, G(-); after glucose-free preconditioning; G(-)+; after G(-) and 45 min ischemia. Cyto and Mem indicate cytosolic and membrane fractions, respectively.

막 분획의 활성도는 IP에서와 같이 현저히 증가하였다(Fig. 6). 본 실험에서는 PKC 중 α , β , δ , ϵ , ζ 등 다섯 가지의 동종효소에 대한 발현을 각각에 대한 단클론 항체를 이용하여 Western blot으로 관찰하였다. 결과, β , δ , ζ 등에서는 유의한 변화가 없었던 반면 α 및 ϵ 에서 양적인 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 7). PKC- α 의 세포질분획의 발현은 기준선이나 허혈 대조군과 비교하여 IP후(IP)에 증가하는 경향을 나타내었으나, 이외의 실험군에서는 큰 변화를 볼 수 없었다. PKC- α 의 세포막분획은 IP후(IP)와, glucose 결핍용액 투여 전처치후(G(-)), glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안 허혈후(G(-)+)에 발현이 증가하는 경향을 나타내었다. PKC- ϵ 의 세포질분획의 발현은 기준선이나 허혈 대조군과 비교하여 IP후(IP)나 IP후 45분 동안 허혈후(IP+I), glucose 결핍용액 투여 전처치(G(-))에 발현이 증가하는 경향을 나타내

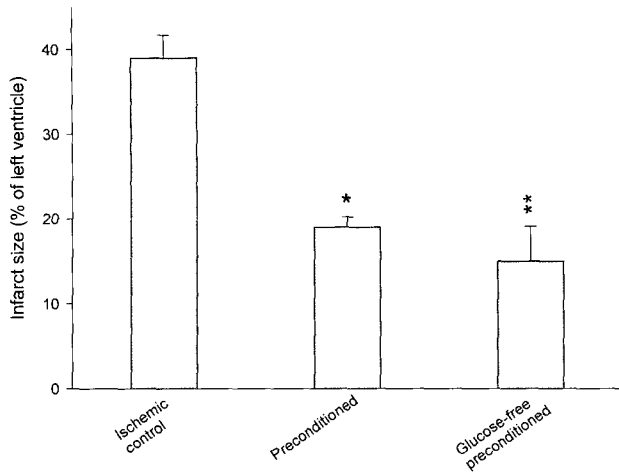


Fig. 8. Infarct size. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs ischemic control.

었다. PKC- ϵ 의 세포막분획은 IP후(IP), IP후 45분 동안 허혈 후(IP+I), 또는 glucose 결핍용액 투여 전처치후(G(-))에 발현이 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 PKC- α 또는 ϵ 동종효소는 glucose 결핍용액 투여 전처치중이나 IP 또는 IP후 45분 동안의 허혈 기간 중에 활성화되어 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였음을 시사하는 것이다.

이상으로 PKC 중 세포막 분획 특히 α 또는 ϵ 동종효소의 활성화도는 IP를 하거나 glucose 결핍용액 투여로 전처치할 경우 증가하는 것으로 판단된다.

3. 심근경색 크기

허혈 대조군, IP군, glucose 결핍용액 투여 전처치군에서 좌심실 전체에 대한 경색크기는 각각 39 ± 2.7 , 19 ± 1.2 , 15 ± 4.1 %로 허혈 대조군에서 가장 컸으며 glucose 결핍용액투여 전처치군에서 가장 작았다. 통계학적으로 IP군과 glucose 결핍용액 투여 전처치군 사이에서는 차이가 없었으나, 두 군 모두 경색 크기는 허혈 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

고 찰

Bailey 등¹⁸⁾은 glucose와 insulin을 투여하여 당원이 증가되게 한 실험에서 허혈중 유산생산이 증가되며 세포내 산증이 악화되는데 이와 같은 현상은 허혈전 심근세포내 당원량과 비례함을 관찰하였다. 이러한 실험 결과로부터 이들은 허혈중에는 심근세포내의 당원이 분해되어 유산 생성이 증가되고 따라서 세포내에서는 산증이 유발되어 손상정도에 영향을 미치게 되는데 당원이 결핍되도록 처리하면 이상의 반응들이 저하되기 때문에 오히려 심근세포의 손상정도는 현저히 감소하는 것으로 추측하였다. 적출 흰쥐 심장을 이용한

실험에서도 glucose를 포함하지 않은 관류액으로 관류할 경우 상당 기간 어어지는 허혈에도 불구하고 심근세포에서는 산증의 전개가 지연되며¹⁹⁾ 재관류시 심장기능의 회복 등이 증가됨²⁰⁾이 관찰된 바 있다. 이상과 같은 배경에서 Wolfe 등¹⁴⁾은 흰쥐 심장을 이용한 실험으로부터 IP를 실시하면 장시간 동안의 허혈 전에 심근세포내에서는 당원결핍이 일어나며 허혈중에도 당원량은 지속적으로 저하되므로 세포내 산증도 현저하지 않음을 관찰하였다. 그들은 당원고갈에 따라 나타나는 심근보호 효과는 당원결핍 정도에 비례하고 세포내 산증 완화를 수반하며, 이러한 효과들은 심근의 산소 요구량이나 고에너지 인산 분해 정도와는 무관하며, 허혈로 고갈되었던 당원량의 회복정도와 심근보호 효과 소실정도는 비례하므로 심근세포내 당원결핍은 IP의 발생기전과 밀접한 관계가 있음을 시사하였다. Soares 등¹⁵⁾도 glucose나 유산을 투여하거나 허혈전 당원량을 증가시킨 실험에서 IP에도 불구하고 심근세포내 물질대사나 심근 수축력의 회복이 현저히 저하됨을 관찰하여 당원결핍이 IP의 발생기전으로 중요성이 있음을 확인하였다.

본 실험결과 허혈 대조군에 비하여 IP를 실시한 경우 LVDP, 심근수축력(dP/dt) 등의 회복율이 현저히 증가하였으며 LVEDP의 상승폭이 낮았으나, glucose 결핍용액 투여 전처치시에는 LVDP, 심근수축력, 관류류 등은 허혈 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았으며 오히려 LVEDP의 상승폭은 재관류 시작후 30분까지는 허혈 대조군에 비하여 현저히 상승하였다. 그러나 심근경색 범위는 허혈 대조군($39 \pm 2.7\%$)과 비교하여 IP시에는 $19 \pm 1.2\%$, glucose 결핍용액 투여 전처치시에는 $15 \pm 3.9\%$ 로 현저히 감소하였으며($p < 0.01$) IP와 glucose 결핍용액 투여 전처치는 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 glucose 결핍용액 투여 전처치를 실시할 경우 후속되는 보다 긴 기간 동안의 허혈후 재관류시 심근의 기능적인 회복에 있어서는 적어도 2시간 이내에는 영향이 없으나 심근경색 범위가 현저히 감소하는 보호효과가 있음을 시사하는 것이다. 그러나 본 실험 결과와는 대조적으로 King과 Opie²¹⁾는 허혈전 심근세포내 당원량이 낮은 경우 고에너지 인산 생산이 저하되므로 IP를 하더라도 그 효과는 미미하며 심근세포에서 심한 수축대 형성을 관찰할 수 있고, 반대로 당원량이 높은 경우에는 당원분해의 대사산물이 지나치게 축적되어 역시 IP의 효과는 미미함을 관찰하고 어느 정도의 당원은 IP의 효과를 얻기 위하여 반드시 필요하다고 기술하고 있다. Asimakis²²⁾도 흰쥐의 적출 심장을 이용한 실험 결과, IP의 유무에 관계없이 장시간 허혈전 심근세포내 당원량에는 커다란 차이가 없었으나 IP를 한 경우에는 재관류시 심근기능의 회복 증가를 관찰할 수 있기 때문에 심근세포내 당원결핍만으로 IP의 발생기전을 설명할 수 없다고

하였다. 본 실험에서 45분이라는 비교적 긴 기간 동안 전체 허혈을 실시하였음에도 불구하고 허혈 대조군과 비교하여 IP 또는 glucose 결핍용액 투여 전처치를 한 경우에는 모두 심근경색 크기가 감소되는 보호효과가 나타난 것은 앞에서도 언급한바와 같이 IP와 glucose 결핍용액 투여 전처치 사이에는 심근보호 효과와 관계 있는 어떤 공통된 발생기전이 개입하고 있음을 시사하는 것이다.

Ytrehus 등⁸⁾은 토끼 심장을 이용한 실험으로부터 PKC 활성화제 staurosporine을 투여하면 심근경색 크기 감소효과가 소실되며 PKC 활성화제 PMA(4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate)를 투여하면 경색크기가 감소됨을 관찰하고 PKC 활성화는 IP에 의한 심근보호 효과 발생에 있어서 중요한 역할을 수행할 것으로 추측하였다. 이들이 내세운 가설에 따르면 IP를 실시하면 심근세포 세포막에 있는 아데노신 수용기 점유로부터 세포질내의 PKC가 활성화되어 이온통로, 미세관(microtubule) 등 단백질 효과기의 인산화가 일어나며 이에 따라 심근수축력 증가가 수반됨으로서 심근보호 효과가 나타난다는 것이다. Armstrong과 Ganote²³⁾는 인산효소 차단제 okadaic acid를 사용하여 단백질로 이루어진 효과기들을 인산화하여 심근보호 효과가 나타남을 관찰하였으며, Downey 등⁷⁾도 미세관 활동을 억제하는 colchicine을 사용하여 IP효과가 차단됨을 관찰하고 PKC의 효과를 확인하였다. 그러나 이상의 실험결과들은 PKC를 정량적으로 분석하여 이루어진 것이 아니라 PKC 활성화제나 차단제를 투여하여 나타난 결과로부터 추론한 것이므로 논란의 여지가 있으며 당원결핍과 PKC 사이의 연관성을 뒷받침할만한 실험 결과는 찾기 어렵다. 이런 관점에서 본 실험에서는 당원결핍과 PKC 활성화 사이의 연관성을 찾기 위하여 PKC 정량에 있어서 비교적 타당한 방법으로 인정되어 있는 PKC-specific peptide와 32P- γ -ATP incorporation을 이용하여 개체당 세번씩 PKC를 정량하였으며 PKC 동종효소에 대한 단클론 항체를 이용하여 Western blot으로 각각의 발현정도를 확인하였다. 결과, PKC 활성화도는 기준선과 비교하여 45분 동안 허혈만 실시한 허혈 대조군에서 87% 정도로 감소하였으며(p<0.05), IP만 실시한 후와 IP후 45분 동안 허혈을 실시한 경우에는 각각 119, 145%로 현저히 증가하였다(p<0.01). Glucose 결핍용액 투여 전처치후와 전처치후 45분 동안 허혈후의 세포막분획 활성화도도 기준선에 비하여 각각 150, 127%로, 특히 glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안의 허혈후에 현저히 증가하였다(p<0.01). 또한 세포질분획의 PKC- α 의 발현정도는 전 실험군 사이에서 유의할만한 차이는 나타나지 않았으나 세포막분획에서는 기준선이나 허혈 대조군과 비교하여 IP후에 증가하는 경향을 나타내었다. PKC- α 의 세포막분획은 IP후

와, glucose 결핍용액 투여 전처치후, glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안 허혈후에 그 발현이 증가하는 경향을 나타내었으며 PKC- ϵ 의 세포질분획의 발현은 IP후나 IP후 45분 동안 허혈후, glucose 결핍용액 투여 전처치후에 증가하는 경향을 나타내었다. PKC- ϵ 의 세포막분획의 발현은 IP후, IP후 45분 동안 허혈후, 또는 glucose 결핍용액 투여 전처치후에 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 PKC- α 또는 ϵ 동종효소가 glucose 결핍용액 투여 전처치중이나 IP 또는 IP후 45분 동안의 허혈 기간중에 활성화되어 세포질에서 세포막 쪽으로 이동하였음을 시사하는 것이다. 그러나 본 실험결과 IP군이나 glucose 결핍용액 투여 전처치군에서 세포질분획의 PKC의 감소는 현저하지 않았다. 이는 세포질분획의 PKC 총량은 세포막분획에 비하여 수배 많기 때문에 세포질분획의 PKC가 활성화되어 세포막으로 이동하였음에도 양적인 면에서는 현저한 차이가 나타나지 않았을 것으로 생각된다. 이와 같이 세포질분획은 양적으로 현저한 변화를 나타내지 않았다 하더라도 세포막분획이 유의하게 증가하였다는 것은 PKC가 세포질에서 세포막으로 전위(translocation)하였음을 의미하는 것이다. 따라서 IP나 glucose 결핍용액 투여 전처치를 실시할 경우 비활성 PKC가 세포막과 같은 활동성이 큰 세포소기관에서 활성화되어 세포막에 존재하는 효과기들을 활성화하는 것으로 판단된다. 그러나 개를 이용한 실험에서는 PKC활성 촉진제를 투여하더라도 경색범위의 정도에 변화가 관찰되지 않았으며²⁴⁾, 더욱이 돼지에서는 PKC 활성화 차단제를 사용했음에도 오히려 경색범위의 감소가 관찰되었다는²⁵⁾ 결과도 있는 만큼 IP와 PKC활성과의 관계에 대해서는 아직도 해결해야 할 부분이 많다. 그러나 본 실험결과와 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 재판류에서는 PKC 등 분자생물학적인 인자보다는 기계적인 인자에 의한 심근기절현상 때문에 나타난 결과임을 배제하기 어렵다²⁶⁾. 이상을 종합하면 심근세포내 당원결핍이 PKC를 활성화시켜주는 자극(stimuli)의 하나인지 혹은 IP효과와 깊은 관련성이 있는 것인지에 대하여는 본 실험만으로 단정하기는 어려우며 IP와 관련하여 PKC활성화가 모든 포유동물에서 공통적으로 나타나는 기전은 아닐 가능성도 있다.

이상으로 적출 관류 토끼 심장에서 장시간 동안의 허혈 전에 glucose 결핍용액을 투여하여 전처치하면 허혈후 재판류시 심근기능의 회복증가는 기대하기 어려우나 IP와 유사한 심근경색 범위 감소효과가 있는 것으로 생각된다.

결 론

심근세포내에서 당원 고갈과 당대사의 증가 및 유산의 심근세포내 축적은 허혈 심근세포 손상의 중요한 원인으로 알려져 있으나 당원이 결핍된 용액으로 짧은 시간 동안 관류할 경우에는 짧은 기간 동안 허혈-재관류를 반복(IP)한 경우와 유사한 결과를 가져올 수 있는 가능성을 조사하여 세포내 신호전달 체계중 PKC와의 관련성을 알아보고자 하였다.

적출 관류 토끼 심장에서 glucose 결핍용액 투여로 전처치할 경우 후속된 장시간 동안의 허혈에 대하여 좌심실기능 회복 증가는 기대할 수 없으나 심근경색 범위가 감소되거나 한정되는 보호효과가 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Hearse DJ, Yellon DM. *Why are we still in doubt about infarct size limitation? The experimentalist's viewpoint.* In: Hearse DJ, Yellon DM. *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation.* New York: Raven Press. 1984;17-41.
2. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. *Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis.* Am J Physiol 1986;251:H1306-H15.
3. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation 1986;74:1124-36.
4. 류호준, 박준수, 김현, 유연호, 라봉진, 김호덕. Ischemic preconditioning의 심근보호 효과에 관한 연구: 좌심실기능, 심근경색부위, protein kinase C 등에 대한 영향. 순환기 1996;26:541-52.
5. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium.* Circ Res 1990; 66:1133-42.
6. Li Y, Kloner RA. *The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts.* Circulation 1993;87:1642-46.
7. Downey JM, Liu Y, Ytrehus K. *Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning.* In: Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM. *Ischemic Preconditioning. The Concept of Endogenous Cardioprotection.* Boston: Kluwer, 1994;137-52.
8. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation.* Am J Physiol 1994;266:H1145-52.
9. 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.
10. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. *Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits.* Circulation 1991;

- 84:341-9.
11. Gross GJ, Auchampach JA. *Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs.* Circ Res 1992;70:223-33.
12. 김 현, 김대중, 김성수, 라봉진, 김호덕. 허혈성 전처치 (ischemic preconditioning)의 심장보호 효과에 관한 연구: adenosine과 protein kinase C의 역할. 순환기 1997;27: 1004-16.
13. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. *Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium.* J Mol Cell. Cardiol 1994;26:661-8.
14. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FLJ, Donnelly TJ. *Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment.* Circulation 1993;87:881-92.
15. Soares PR, de Albuquerque CP, Chacko VP, Gerstenblith G, Weiss RG. *Role of preischemic glycogen depletion in the improvement of postischemic metabolic and contractile recovery of ischemia-preconditioned rat hearts.* Circulation 1997;96:975-83.
16. Henning SL, Wambolt RB, Schonekess BO, Lopaschuk GD, Allard MF. *Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization.* Circulation 1996;93:1549-55.
17. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4.* Nature 1970;227:681-5.
18. Bailey IA, Radda GK, Seymour AML, Williams SR. *The effects of insulin on myocardial metabolism and acidosis in normoxia and ischaemia.* Biochem Biophys Acta 1982; 720:17-27.
19. Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ. *Studies of acidosis in the ischemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance.* Biochem J 1979;184:547-54.
20. Neely JR, Grotyohann LW. *Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts.* Circ Res 1984;55:816-24.
21. King LM, Opie LH. *Does preconditioning act by glycogen depletion in the isolated rat heart?* J Mol Cell Cardiol 1996;28:2305-21.
22. Asimakis GK. *Myocardial glycogen depletion cannot explain the cardioprotective effects of ischemic preconditioning in the rat heart.* J Mol Cell Cardiol 1996; 28:563-70.
23. 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.
24. Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. *Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model?* Circulation 1995; 92:1546-77.
25. Vogt A, Barancik M, Weihrauch D, Arras M, Podzuweit

T, Schaper W. *Protein kinase C inhibitors reduce infarct size in pig heart in vivo.* Circulation 1994; 90(Suppl. I): I-647.

26. 김용환, 손동섭, 조대윤, 양기민, 김호덕. 적출관류 토끼 심장에서 캄슌 전처치에 의한 심근보호 효과와 Protein Kinase C와의 관계. 대흉외지 1999; 32:603-12.

=국문초록=

연구배경: 심근세포내 에너지원인 당원 pool의 고갈이나 당대사의 증가와 이로 인한 유산의 심근세포내 축적은 허혈 심근세포 손상의 중요한 원인으로 알려져 있다. 그러나 역설적으로 당원이 결핍된 용액으로 짧은 시간 동안 관류할 경우 이는 짧은 기간 동안 허혈-재관류를 반복(IP)한 경우와 유사한 결과를 가져올 수 있는 가능성을 조사하여 세포내 신호전달체계 중 PKC와의 관련성을 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** Langendorff방법에 따라 관류하여 기준선 혈역학 값이 유지되면 전체 허혈(5분)-재관류(10분) 1회 실시로 IP를 유도하고 45분 동안 전체 허혈후 120분 동안 재관류하였다(IP군, n=13). 허혈 대조군(n=10)에서는 IP없이 45분 동안 전체 허혈후 120분 동안 재관류를 실시하였다. Glucose 결핍용액 투여 전처치군(n=12)에서는 기준선 혈역학 값이 유지되면 5분 동안 glucose를 포함하지 않은 관류액으로 관류한 후 10분 동안 표준 관류액으로 관류하고 45분 동안 허혈을 실시한 후 120분 동안 재관류하였다. 전 실험 기간 동안 좌심실기능, 관혈류를 측정하였으며 실험 종료후 PKC활성도는 PKC-specific peptide와 32P- γ -ATP incorporation으로 PKC활성도 (nmol/g tissue)를 측정하였다. PKC 동종효소의 발현정도는 단클론항체(α , β , δ , ϵ , ζ 등)를 사용하여 Western blot로 확인하였다. 심근경색 크기는 1% tetrazolium chloride로 염색하여 형태 계측하였다. **결과:** 45분 동안 허혈후 LVDP(LV developed pressure), dp/dt 등은 다른 실험군에 비하여 IP군에서 현저히 증가하였으나 glucose 결핍용액 투여 전처치군에서는 허혈 대조군과 큰 차이가 없었으며 관혈류량은 모든 실험군 사이에서 차이를 나타내지 않았다. 그러나 glucose 결핍용액 투여 전처치군(15 \pm 3.9%)과 IP군(19 \pm 1.2%)에서는 허혈 대조군(39 \pm 2.7%)에 비하여 심근경색 범위의 현저한 감소를 볼 수 있었다(p<0.05). PKC 활성도는 기준선과 비교하여 허혈 대조군에서는 87% 정도로 감소하였으며(p<0.05), IP만 실시한 후와 IP후 45분 동안 허혈을 실시한 경우에는 각각 119, 145%로 현저히 증가하였다(p<0.01). Glucose 결핍용액 투여 전처치후와 전처치후 45분 동안 허혈후의 세포막분획 활성도도 기준선에 비하여 각각 150, 127%로, 특히 glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안의 허혈후에 현저히 증가하였다(p<0.01). PKC 동종효소중 β , δ , ζ 등에서는 발현정도에 유의한 변화가 없었던 반면 α 및 ϵ 에서 양적인 변화를 관찰할 수 있었다. PKC- α 의 세포질분획의 발현은 기준선이나 허혈 대조군과 비교하여 IP후에 증가하는 경향을 나타내었으나, 이외의 실험군에서는 큰 변화를 볼 수 없었다. PKC- α 의 세포막분획은 IP후와, glucose 결핍용액 투여 전처치후, glucose 결핍용액 투여 전처치후 45분 동안 허혈후에 증가하는 경향을 나타내었다. PKC- ϵ 의 세포질분획의 발현은 기준선이나 허혈 대조군과 비교하여 IP후나 IP후 45분 동안 허혈후, glucose 결핍용액 투여 전처치에 증가하는 경향을 나타내었으며 PKC- ϵ 의 세포막분획은 IP후, IP후 45분 동안 허혈후, 또는 glucose 결핍용액 투여 전처치후에 발현이 증가하는 경향을 나타내었다. **결론:** 이상으로 적출 관류 토끼 심장에서 glucose 결핍용액 투여로 전처치할 경우 후속된 장시간 동안의 허혈에 대하여 좌심실기능 회복 증가는 기대할 수 없으나 심근경색 범위가 감소되거나 한정되는 보호효과가 있음을 알 수 있었다.

중심단어: 1. 허혈성 전처치
2. 심근보호
3. 당원