

쥐의 심장에서 허혈성 후처치는 아편유사물질 수용체의 활성화에 의해서 사립체 투과 전이공 개방을 억제한다.

계명대학교 의과대학 동산의료원 마취통증의학과, *약리학과, †내과

이용철 · 장영호 · 김진모 · 김애라 · 이성룡* · 김윤년[†] · 홍지희

Ischemic Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore via Opioid Receptor Activation in Intact Rat Heart

Yong Cheol Lee, M.D., Young Ho Jang, M.D., Jin Mo Kim, M.D., Ae Ra Kim, M.D., Seung Ryong Lee, M.D.*, Yoon Nyun Kim, M.D.[†], and Ji Hee Hong, M.D.

Departments of Anesthesiology and Pain Medicine, *Pharmacology and †Internal Medicine, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Background: Ischemic postconditioning (Post-C), brief cycles of myocardial ischemia and reperfusion during the early phase of reperfusion, is considered as a novel adjunct strategy to protect myocardium. However, the exact mechanism remains unclear and should be determined.

Methods: The hearts of male Wistar rats were subjected to 30 min ischemia and 2 hrs reperfusion. Control rats had no intervention either before or after left coronary artery occlusion. Post-C was elicited by 6 cycles of 10s reperfusion interspersed by 10s ischemia immediately after onset of reperfusion. Subsets of postconditioning rats were treated with drugs as followings; naloxone (non-selective opioid receptor antagonist), naltrindole (a δ -opioid receptor antagonist), SB216763 (a glycogen synthase kinase 3 β inhibitor, GSK-3 β inhibitor), or atractyloside (a mitochondrial permeability transition pore opener, mPTP opener).

Results: Post-C significantly reduced infarct size ($15.9 \pm 2.4\%$, $P = 0.003$) compared to control ($29.9 \pm 3.7\%$). The anti-infarct effect by Post-C was blocked by both naloxone ($25.5 \pm 3.9\%$, $P = 0.044$) and naltrindole ($26.9 \pm 2.3\%$, $P = 0.022$). Infarct size limiting effect by Post-C was also abolished by atractyloside ($30.6 \pm 3.6\%$, $P = 0.003$). In SB216763 with naloxone treated animals, the infarct size was decreased ($17.4 \pm 3.2\%$, $P = 0.007$) but not in SB216763 with atractyloside treated animals ($27.4 \pm 2.6\%$) compared to control.

Conclusions: These data suggest that Post-C may protect myocardium by inhibiting mPTP opening via δ -opioid receptor activation. GSK-3 β is a downstream mediator of opioid receptors and an upstream mediator of mPTP opening in Post-C. (Korean J Anesthesiol 2008; 54: 320~7)

Key Words: ischemia, mitochondria, opioid receptor, postconditioning, reperfusion.

서 론

지난 20여년 동안 심장 허혈 및 재관류 손상을 예방하기 위하여 Murry 등이¹⁾ 제안한 지표 허혈(index ischemia) 직전의 간헐적 혈류차단과 재개통의 반복 조작에 의한 허혈성

전처치(ischemic preconditioning, 이하 전처치)가 심근 보호를 위한 주요 연구 대상이 되어왔다. 그러나 이 방법은 무체외 순환 관상동맥 우회로술과 같은 극히 제한적인 상황에서만 임상적으로 적용될 수 있다는 한계가 있다. 따라서 임상에서는 재관류 시기에 심장을 보호하는 처치가 보다 유용한 방법이 될 것이다. 이러한 측면에서 최근 Zhao 등은²⁾ 실험견을 대상으로 지표 허혈 직후의 허혈성 후처치(ischemic postconditioning, 이하 후처치) 즉, 지표 허혈 직후 짧은 기간 동안의 간헐적 혈류차단과 재개통의 반복 조작이 전처치와 유사한 정도로 재관류 후 심근 괴사 예방 효과를 가진다고 최초로 보고하였다. 또한 후처치는 재관류 후 혈장 크레아틴키나아제 활성성을 감소시키고, 심장의 허혈 위험 영역에

논문접수일 : 2008년 1월 8일

책임저자 : 장영호, 대구시 중구 동산동 194

계명대학교 동산의료원 마취통증의학과

우편번호: 700-712

Tel: 053-250-7287, Fax: 053-250-7240

E-mail: weonjo@hotmail.com

박사학위 논문임.

서 중성구 축적을 감소시키며, 내피세포 기능을 유지하고, 재판류 시 나타나는 빈부정맥에 대한 강력한 항부정맥 효과도 함께 나타낸다.^{3,5)} 이러한 후처치의 재판류 손상 예방 효과는 개,²⁾ 토끼,³⁾ 쥐⁵⁾ 등과 같이 동물의 종에 관계없이 나타나며, 박동성 심장 및 배양된 심근세포 모두에서 효과를 나타낸다.⁶⁾

후처치가 심근 재판류 손상을 감소시키는 세포내 기전에 대하여 현재 많은 연구들이 진행되고 있다. Penna 등은⁴⁾ 쥐를 대상으로 10초 간격으로 5회의 후처치를 시행한 결과 재판류 시 유산탈수소효소 생성이 감소되고 이의 감소는 심근 괴사 감소와 비례하였다고 하였으며, 이에는 guanylyl cyclase 활성화가 중요한 역할을 한다고 하였다. Zatta 등은⁷⁾ 쥐를 대상으로 30분간 관상동맥 결찰 후 10초간 3회의 후처치를 시행한 실험에서 후처치에 의한 심근 괴사 예방 효과는 세포내 protein kinase-C (PKC) 특히 PKC ϵ 의 활성화에 의한다고 하였다. 한편 Yang 등은³⁾ 토끼에서 30초 간격으로 4회의 후처치를 시행한 결과 심근 괴사의 예방기전에는 세포외신호조절키나아제(extracellular-signal regulated kinase, ERK), 산화질소 및 사립체(mitochondria) K_{ATP} 통로가 관여한다고 보고하였다. 또한 최근에는 ERK 및 phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase)/Akt와 같은 재판류 손상 구제 효소(reperfusion injury salvage kinases)들에 의한 세포내 신호전달 경로가 후처치 기전에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다.^{8,9)} 이처럼 재판류 시 후처치에 의한 심근 보호에 대하여 다양한 기전들이 보고되어 있으나 아직까지 분명하지는 않다.

한편 후처치에 adenosine 수용체 활성화가 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, Kin 등은¹⁰⁾ 쥐를 이용한 후처치 시 선택적 A_{2A} 및 A₃ adenosine 수용체 억제제인 ZM241385와 MRS1523을 사용한 연구 결과 adenosine 수용체 활성화가 재판류 후 심근 괴사 예방과 관련이 있으며, 재판류 초기에 시행한 후처치가 혈관으로부터 adenosine의 방출을 지연시켜 adenosine 수용체가 활성화됨으로 인하여 심근을 보호한다고 하였다. 또한 Lu 등은¹¹⁾ 최근 후처치가 A₁ adenosine 수용체와도 관련이 있음을 보고하였다. 한편 Schultz 등이¹²⁾ 전처치에 아편유사물질 수용체의 활성화가 심근 보호의 유발 인자(trigger factor) 및 매개 인자(mediator) 역할을 한다고 보고한 이후로 재판류 손상 예방을 위하여 마약성 약물의 유용성에 대한 관심이 증가하고 있다. 그러나 아직까지 후처치가 아편유사물질 수용체를 활성화 시키는지에 대해서는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 후처치에 의한 심근 보호 효과는 adenosine 수용체 활성화만이 아니라 아편유사물질 수용체 활성화에 의하여 발생될 가능성도 있다는 가정 하에 시행하였다.

최근 연구에 의하면 허혈 및 재판류 후 세포사에 사립체가 중요한 역할을 하며, 전처치 및 후처치 조작 시 발생되

는 세포내 신호전달체계 역시 사립체와 관련이 있음이 알려지고 있다.^{13,14)} 사립체 내벽에 있는 비특이성 투과전이공(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)의 개방은 막전위를 허탈시키고 호흡사슬 고리를 끊으며, cytochrome c 및 세포자멸사 유도 인자(apoptosis-inducing factor)들을 방출시켜 세포자멸사 혹은 괴사를 야기하게 된다.¹⁵⁾ 또한 후처치가 다양한 세포내 신호전달체계를 통하여 mPTP 개방을 억제시켜 심근을 보호한다고 알려지고 있다.¹⁴⁾ 한편 Park 등은¹⁶⁾ 재판류 시 A₃ adenosine 작용제인 IB-MECA 투여에 의한 adenosine 수용체 자극 후 glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)의 억제에 의하여 mPTP 개방이 억제됨을 보고한 바 있다. 또한 재판류 시 마약성 약물의 투여가 GSK-3 β 억제를 통하여 심장을 보호한다는¹⁷⁾ 보고가 있으므로 본 연구에서는 후처치가 아편유사물질 수용체를 활성화시키고 이것이 GSK-3 β 억제를 통하여 mPTP 개방을 억제시켜 심장의 재판류 손상을 감소시킬 것이라는 가정 하에 본 연구를 시행하였다. 한편 재판류 후 심근 생존을 연구함에 있어 혈액학적 지표와 같은 기능적 회복은 기절현상 혹은 비허혈성 심근으로부터의 보상 운동 등에 의하여 유용한 지표가 될 수 없으며, 심근 괴사 정도가 가장 유용한 지표가 되므로¹⁸⁾ 본 연구에서는 재판류 후 심근 괴사 정도를 비교함으로써 후처치에 의한 세포내 기전을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

약물 및 화학물질

마취제로 pentobarbital sodium (Entobar[®], 한림제약, 대한민국)을 이용하였고 실험용 처치약물로 비특이성 아편유사물질 수용체 길항제인 naloxone hydrochloride (Tocris Cookson Inc., USA)와 선택적 δ -아편유사물질 수용체 길항제인 naltrindole hydrochloride (Tocris Cookson Inc., USA)는 증류수에, GSK-3 β 억제제인 SB216763 (Tocris Cookson Inc., USA)은 dimethyl sulfoxide에 녹여 사용하였다. mPTP 개방제로 atractyloside (Sigma Chemical Co., USA)를 이용하였고 허혈위험 영역 및 괴사 영역을 측정하기 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma Chemical Co., USA)와 형광 중합체 미세구 (fluorescent polymer microsphere, Duke Scientific Corp., USA)를 사용하였다.

동물의 마취 및 외과적 처치

모든 동물실험은 본 대학 실험 동물 사용 관리 위원회의 심의 후 규정에 따라 시행되었다. 체중 280–350 gm의 수컷 Wistar 쥐(Korea Taconic Co., 대한민국)를 대상으로 40 mg/kg의 pentobarbital sodium을 복강내로 주입하여 마취를 하였다. 이후 필요에 따라 pentobarbital sodium을 초회량의

1/2-1/3 용량으로 복강내 추가 투여하였다. 백서의 등 밑에 가온 매트를 깔아 직장 체온을 측정하면서 체온을 37-38°C로 유지하였다. 마취된 쥐의 체중을 측정 후 기관절개를 시행하여 14게이지 카테타를 기관내로 삽관하여 동물용 환기(Harvard Rodent Ventilator, Harvard Bioscience Co., USA)에 연결하였으며, 일회환기량을 1 ml/100 gm, 호흡수를 45-60회/분으로 조절하여 실내 공기로 환기시켰다. 간헐적으로 혈액가스분석을 시행하여 탄산수소나트륨 정주 혹은 환기량 조절에 의하여 pH를 7.4로 유지시켰다.

우측 외경정맥을 절개한 후 24게이지 혈관 카테타를 삽입하여 지속적으로 수액을 투여하는 경로로 사용하였으며, 좌측 경동맥을 절개하여 카테타를 삽입한 후 압력 변환기(MP150, BIOPAC Systems Inc., USA)에 연결하여 혈압을 측정하였다. 좌측 4번째 혹은 5번째 늑골간을 절개하여 흉곽을 노출시킨 다음 심장박을 절개하여 심장 및 관상동맥을 노출시켰다. 좌관상동맥 근위부 아래에 6-0 프로틴 실(Ethicon Inc., USA)을 거치하여 양쪽 실끝을 PE50 플라스틱 튜브에 통과시켜 올가미를 만들어 좌관상동맥을 가역적으로 결찰 및 재개통이 가능하도록 하였다. 이후 100 U/kg의 헤파린을 정주하여 전신 헤파린화를 유도하였다.

실험 프로토콜

최소 30분간의 안정기를 가진 후 올가미를 결찰함으로써 부위 허혈을 유도하였으며, 올가미 결찰 말단 부위 심장의 청색화로 부위 허혈을 확인하였다. 재관류는 결찰된 올가미를 풀어 유도하였다. 모든 심장의 부위 허혈은 30분간 시행하였고, 재관류는 2시간 동안 시행하였다. 동물을 무작위로 하여 아래의 세 종류 실험이 시행되었으며, 각 군당 최소 7마리의 쥐가 사용되었다. 정주된 약물의 용량은 쥐에 사용된 기존 보고들을 근거로 결정하였다(naloxone 3 mg/kg, naltrindole 5 mg/kg, SB216763 0.6 mg/kg, atractyloside 5 mg/kg).^{17,19-21)} 모든 실험약물들은 2.5 mM 이하의 저장액을 만든 다음 4°C에 저장하여 사용하였으며, 재관류 5분 전부터 재관류 후 60분까지, 총 65분간 정주되었다(Fig. 1).

후처치와 아편유사물질 수용체의 관련성 연구: 대조군은 좌관상동맥 결찰 전과 후에 어떠한 조치도 취하지 않았으며, 후처치군은 Tsang 등에²²⁾ 의한 지표 허혈 종료 직후 10초간씩 재관류 및 부위 허혈을 6회(총 2분) 시행하였다. 후처치가 아편유사물질 수용체를 활성화시키는지 알아보기 위하여 후처치 시 비특이성 아편유사물질 수용체 길항제인 naloxone을 사용한 군 및 선택적 δ-아편유사물질 수용체 길항제인 naltrindole을 사용한 군에서 재관류 2시간 후 심근 괴사 정도를 대조군 및 후처치군과 비교하였다.

후처치와 mPTP 관련성 연구: 실험 2에서는 후처치로 인한 심장보호 기전에 mPTP가 관련되는지를 알아보려고 하

였다. 이를 위하여 동물들을 무작위로 후처치 시 atractyloside를 투여하여 재관류 2시간 후 심근 괴사 정도를 대조군 및 후처치를 시행한 군과 비교하였다.

후처치와 GSK-3β 관련성 연구: 실험 3에서는 재관류 시 투여하는 아편유사물질 수용체 작용 약물이 GSK-3β를 억제시켜 심장을 보호한다는¹⁷⁾ 보고에 근거하여 후처치 시 GSK-3β의 억제가 후처치에 의한 아편유사물질 수용체 활성화의 직접적인 하향 매개인자(downstream mediator)가 되는지, 그리고 GSK-3β가 mPTP 개방 억제 기전의 상향 매개인자(upstream mediator)가 되는지를 알아보려고 하였다. 이를 위하여 동물을 무작위로 하여 후처치 시 naloxone 및 SB216763을 함께 투여한 군과 atractyloside와 SB216763을 함께 투여한 군을 대조군 및 후처치 군과 비교하였다.

실험 제외 기준

안정화 기간이 경과하여도 심박동수가 분당 250회 이하인 경우 혹은 부정맥이 지속되는 경우의 심장은 연구에서 제외되기로 하였다. 또한 실험 기간 동안 탄산수소나트륨 투여 및 환기량 조절에도 불구하고 산-염기 조절이 되지 않는 경우 및 재관류 후 심장 박동 회복을 시켜도 심실세동이 지속되는 경우는 결과 값에서 제외하였다.

허혈 위험 영역 및 괴사 영역의 측정

실험 종료(재관류 2시간) 후 심장의 허혈 위험 영역(area at risk, AAR)과 괴사 영역(area at necrosis, AN)을 측정하였다. 이를 위하여 재관류 종료 후 좌관상동맥에 거치한 올가미를 다시 결찰하였으며, 심장을 Langendorff 시스템에 거치한 후 증류수로 혈액을 제거한 다음 희석된 2-9 μm 직경

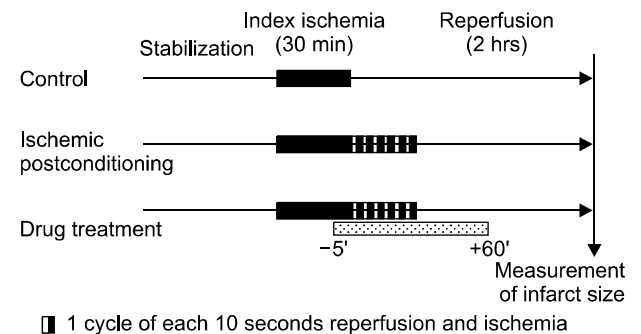


Fig. 1. Experimental protocols for animal groups. For measurement of infarct size, hearts were exposed to 30 min regional ischemia followed by 2 hrs reperfusion. Ischemic postconditioning was performed by 6 cycles of 10 seconds of reperfusion followed by 10 seconds of regional ischemia immediately after the index ischemia. Drugs were infused from 5 min before reperfusion to first 1 hr of reperfusion (hatched rectangle).

Table 1. Morphometrics in Animals

	n	Body weight (gm)	Heart weight (gm)	AAR (cm ³)	AN (cm ³)
Control	8	320.3 ± 3.0	1.57 ± 0.09	0.295 ± 0.022	0.085 ± 0.009
Post-C	7	321.7 ± 3.3	1.57 ± 0.05	0.304 ± 0.025	0.051 ± 0.009*
NAL	7	314.9 ± 4.5	1.55 ± 0.09	0.281 ± 0.014	0.070 ± 0.008
NTD	7	326.6 ± 4.6	1.54 ± 0.05	0.294 ± 0.019	0.080 ± 0.009 [†]
ATR	7	324.0 ± 7.0	1.44 ± 0.08	0.289 ± 0.017	0.086 ± 0.007 [†]
NAL+SB	7	312.6 ± 4.6	1.60 ± 0.11	0.270 ± 0.033	0.053 ± 0.033*
ATR+SB	7	312.0 ± 2.1	1.56 ± 0.09	0.278 ± 0.014	0.075 ± 0.008

Values are Mean ± SEM. There were no differences in body weight, heart weight, and AAR among groups. n: number of animals. Post-C: ischemic postconditioning, NAL: naloxone, NTD: naltrindole, ATR: atractyloside, SB: SB216763, AAR: area at risk, AN: area at necrosis. Post-C was performed with 6 cycles of 10s reperfusion and 10s regional ischemia. All drugs were administered with postconditioned animals. *: P < 0.05 vs. Control, [†]: P < 0.05 vs. Post-C.

의 형광 중합체 미세구 3 ml를 대동맥을 통하여 서서히 주입하였다. 심장을 Langendorff 시스템에서 분리한 후 무게를 측정 후 -20°C에 1-3시간 냉동시킨 다음 1 mm의 두께로 수평으로 절개하였다. 절편들을 37°C의 sodium phosphate 완충액에 녹인 1% TTC 용액(pH = 7.4)에 20분 담근 후 10% 포르말린 용액에 넣어 염색이 되는 생존 영역(viable area)과 염색이 되지 않는 AN이 명확하게 되도록 하였다. 이후 절편들을 유리판 위에 놓고 또 다른 유리판으로 덮었으며 두 유리판 간격은 1 mm가 되도록 하였다. 유리판 위에 아세테이트 투명지를 놓고 자외선 발생기를 이용하여 형광 중합체 미세구가 보이는 AAR과 TTC에 의하여 염색이 되지 않은 AN을 그린 후 스캔한 다음 Image Tool 프로그램(UTHSCSA Image Tool, version 3.0)을 이용하여 정량화하였다. AAR과 AN은 면적과 두께를 이용하여 부피로 환산하였으며, 심장의 괴사 영역은 허혈 위험 영역에 대한 비율(AN/AAR)로 표현하였다. 모든 영역의 측정은 본 동물실험에 직접 참여하지 않은 연구자에 의한 맹검법으로 시행되었다.

통계 처리

결과값은 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 결과 분석은 SPSS 프로그램(SPSS for windows, version 12.0, USA)을 이용하여 one-way ANOVA와 사후 검정으로는 Least Significant Difference test를 시행하였고 P값이 0.05 미만인 경우를 유의있는 것으로 간주하였다.

결 과

총 54마리의 쥐가 이용되었으며, 실험 안정기 동안 분당 250회 이하의 서맥(2마리), 지속적인 부정맥(1마리), 그리고 대조군에서 재관류 후 지속적인 심실세동(1마리)이 발생한 4마리는 결과 값에서 제외하여 총 50마리의 쥐에서의 결과를 비교하였다. 각 군에서 쥐의 체중, 적출된 심장 무게의

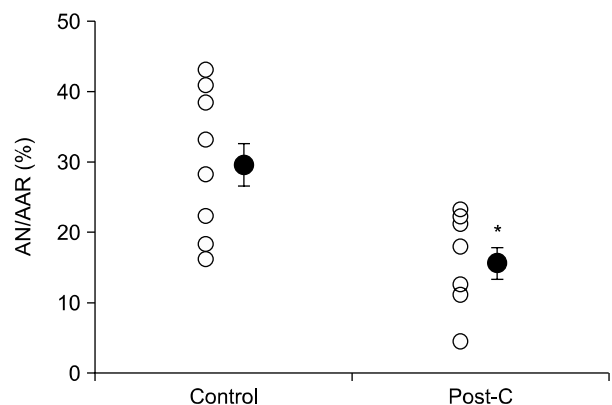


Fig. 2. Infarct size expressed as percentage of the area at risk. Open circles indicate the infarct sizes from individual hearts. Filled circles in each group indicate the group mean infarct size; mean ± SEM. AN: area at necrosis, AAR: area at risk, Post-C: ischemic postconditioning. Post-C significantly reduced AN/AAR in rat hearts. *: P < 0.05 vs. control.

차이는 없었다(Table 1). 본 실험에서 유발된 AAR의 최소값은 후처치군에서 naloxone과 SB216763을 함께 투여한 군에서 평균 0.270 cm³였으며, 최고값은 후처치를 유발한 군에서 0.304 cm³로 각 군간 차이가 없어 부위 허혈의 유발 정도는 유사함을 나타내었다.

후처치와 아편유사물질 수용체의 관련

대조군에서 AN/AAR은 29.9 ± 3.7%였으며, 재관류 시 10초간 6회 시행한 후처치군에서 AN/AAR은 15.9 ± 2.4%로 대조군에 비하여 유의있게 감소하였다(P = 0.003, Fig. 2). 후처치에 아편유사물질 수용체 활성화 여부를 알아보기 위하여 후처치를 시행하는 동물에서 비선택성 아편유사물질 수용체 길항제인 naloxone과 선택적 δ-아편유사물질 수용체 길항제인 naltrindole을 투여한 결과 AN/AAR이 각각 25.5 ±

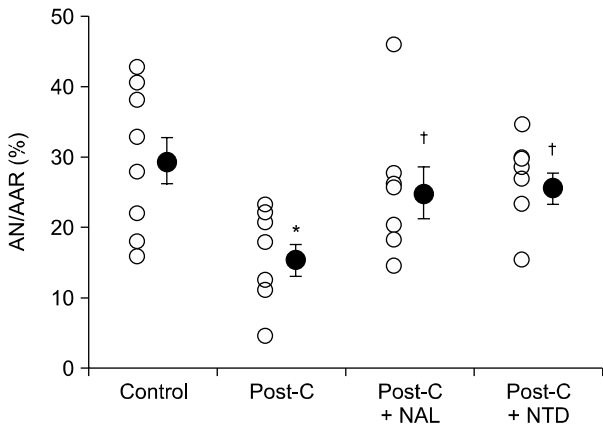


Fig. 3. Infarct size expressed as percentage of the area at risk. Open circles indicate the infarct sizes from individual hearts. Filled circles in each group indicate the group mean infarct size; mean \pm SEM. AN: area at necrosis, AAR: area at risk, Post-C: ischemic postconditioning, NAL: naloxone, NTD: naltrindole. The anti-infarct effect by Post-C was totally blocked by both nonspecific opioid receptor antagonist naloxone and δ -opioid receptor antagonist naltrindole. *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. Post-C.

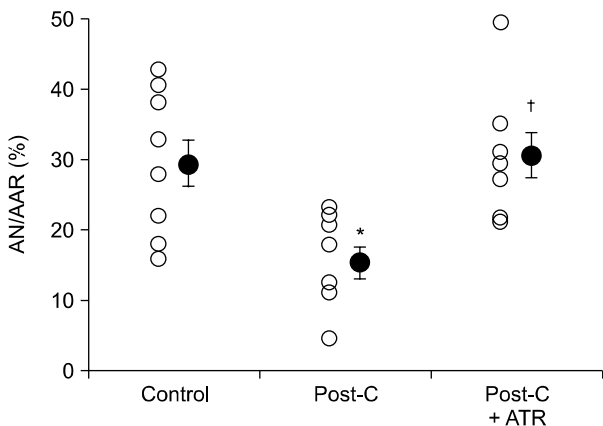


Fig. 4. Infarct size expressed as percentage of the area at risk. Open circles indicate the infarct sizes from individual hearts. Filled circles in each group indicate the group mean infarct size; mean \pm SEM. AN: area at necrosis, AAR: area at risk, Post-C: ischemic postconditioning, ATR: atractyloside. The anti-infarct effect by Post-C was totally blocked by mitochondrial permeability transition pore opener atractyloside. *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. Post-C.

3.9% ($P = 0.044$) 및 $26.9 \pm 2.3\%$ ($P = 0.022$)로 후처치에 의한 항괴사 작용이 상쇄되었다(Fig. 3).

후처치와 mPTP의 관련

후처치에 의한 심장 보호 기전에 mPTP의 관련을 알아보기 위하여 후처치 시 mPTP 개방제인 atractyloside를 투여한

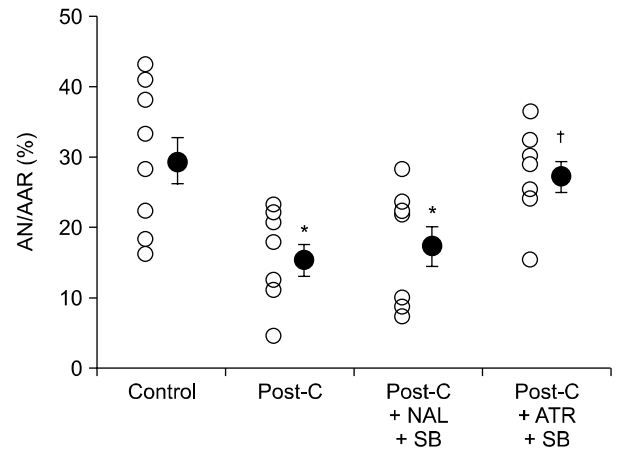


Fig. 5. Infarct size expressed as percentage of the area at risk. Open circles indicate the infarct sizes from individual hearts. Filled circles in each group indicate the group mean infarct size; mean \pm SEM. AN: area at necrosis, AAR: area at risk, Post-C: ischemic postconditioning, NAL: naloxone, ATR: atractyloside, SB: SB216763 (a GSK-3 β inhibitor). These results shows GSK is a downstream mediator of δ -opioid receptor activation and an upstream mediator of mitochondrial permeability transition pore opening. *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. Post-C.

결과 AN/AAR은 $30.6 \pm 3.6\%$ 로 후처치군에 비하여 유의있게 증가하였다($P = 0.003$, Fig. 4).

후처치와 GSK-3 β 의 관련

후처치 기전의 조절인자로서 GSK-3 β 의 역할을 알아보기 위하여 후처치 시 naloxone과 SB216763을 함께 투여한 군에서 AN/AAR이 $17.4 \pm 3.2\%$ 로 대조군에 비하여 유의있게 감소하였으며($P = 0.007$), atractyloside와 SB216763을 후처치 시 함께 투여한 군에서는 AN/AAR이 $27.4 \pm 2.6\%$ 로 대조군에 비하여 차이가 없었으나 후처치군에 비하여 유의있게 증가하였다($P = 0.017$, Fig. 5).

고 찰

2003년 Zhao 등에²⁾ 의하여 후처치가 전처치와 유사한 정도로 재판류 후 심근 괴사를 감소시킨다는 보고가 발표된 이후로 이의 기전을 밝히고자 많은 연구들이 시행되고 있다. 본 연구 결과 후처치 시 naloxone 및 naltrindole의 투여가 후처치에 의한 심근 괴사 감소 작용을 상쇄시켰으며, 이는 아편유사물질 수용체 특히 δ -아편유사물질 수용체 활성화가 후처치에 의한 심근 보호 기전에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 또한 mPTP 개방제인 atractyloside를 후처치 시 투여한 결과 이 역시 후처치에 의한 심근 괴사 감소 작용을 상쇄시켰는데, 이러한 결과는 후처치에 의한 재판류

후 심근 보호에 mPTP 개방 억제에 중요한 역할을 함을 의미한다. 또한 GSK-3 β 억제제인 SB216763과 함께 naloxone 혹은 atractyloside를 각각 투여한 결과를 통하여 GSK-3 β 가 아편유사물질 수용체의 하향 매개인자가 되고 mPTP의 상향 매개인자가 됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 후처치가 δ -아편유사물질 수용체를 활성화시켜 GSK-3 β 를 억제시키고 이것이 mPTP 개방을 억제시킴으로 인하여 심근 재관류 손상을 감소시킴을 보여준다.

허혈 및 재관류와 같은 스트레스 시 심근에서는 adenosine, 아편유사제, bradykinin 등과 같은 여러 가지 물질들이 자가분비되어 세포막에 존재하는 G-단백 결합 수용체(G-protein coupled receptor, GPCR)들을 활성화시키며,²³⁾ 활성화된 GPCR로부터의 신호는 세포내에서 다양한 신호 전달 경로를 통하여 심근을 보호하게 된다. 한편 후처치 시 adenosine 수용체 활성화에 의하여 재관류 손상이 예방될 수 있음이 밝혀져 있으나^{10,24)} 후처치 이전에 아편유사물질 수용체의 활성화가 관여하는 지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 1995년 최초로 아편유사물질 수용체 활성화가 전처치에 의한 심근 보호 기전에 관여한다는 보고가¹²⁾ 발표된 이후로 심장 재관류 손상을 예방하기 위하여 아편유사물질 수용체 활성화에 대한 많은 연구들이 진행되어왔다. Schultz 등은²⁵⁾ 전처치 및 지표 허혈 이전에 투여한 morphine에 의한 심근 보호 작용이 naltrindole에 의하여 상쇄되었는 바 δ -아편유사물질 수용체의 활성화가 전처치 및 morphine에 의한 심근 보호 작용에 중요한 역할을 함을 보고하였다. 본 연구 결과 후처치 시 투여된 naltrindole이 재관류 후 심근 괴사 감소를 상쇄시켰으며, 이는 후처치 역시 전처치와 마찬가지로 δ -아편유사물질 수용체의 활성화가 재관류 후 심장 보호의 중요한 기전이 됨을 알 수 있었다.

한편 심근에는 μ -아편유사물질 수용체 없이 δ - 및 κ -아편유사물질 수용체가 존재하는데²⁶⁾ 현재까지 심장 허혈 및 재관류 손상에 대한 κ -아편유사물질 수용체의 역할에 대해서는 많은 논란이 있다. Aitchison 등은²⁷⁾ κ -아편유사물질 수용체 작용 약물인 bremazocin이 재관류 후 심근 괴사를 악화시킨다고 하였으며, Wong 등은²⁸⁾ κ -아편유사물질 수용체 작용 약물인 U50488H를 투여한 결과 허혈성 부정맥이 악화되었다고 보고하였다. 이와는 달리 Wang 등은²⁹⁾ 전처치로 인한 κ -아편유사물질 수용체 활성화가 허혈로 인한 심근 괴사 및 부정맥을 감소시킨다고 하였으며, Peart 등³⁰⁾ 역시 지표 허혈 10분 전에 투여한 κ -아편유사물질 수용체 활성화 약물들이 심근 괴사를 감소시킨다고 하였다. 이상의 결과들로 미루어 보아 κ -아편유사물질 수용체 활성화가 심근 보호 작용을 가짐을 배제할 수는 없다. 그러나 본 연구에서는 후처치와 δ -아편유사물질 수용체에 관한 연구만을 하였으므로 후처치와 κ -아편유사물질 수용체와의 관련성에

대해서는 차후 추가적인 연구가 필요할 것이다.

GSK는 전사(transcription), 대사, 세포분열 및 세포자멸사 등과 같은 세포내 과정에 관여하는 중요한 효소 중의 하나이다.³¹⁾ GSK는 다른 단백질효소들에 비하여 상당히 높은 기저 활성성을 가지고 있으며, 화학 구조 상 N-terminal glycine-rich tail에 의하여 GSK- α (51 kDa)와 GSK- β (47 kDa)의 두 가지 이성체로 구분된다. 이 중 GSK- β 비활성화가 심장 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GSK- β 는 Ser⁹와 Tyr²¹⁶에서 인산화가 되는데 Ser⁹의 인산화는 GSK 활성성을 감소시키고 Tyr²¹⁶의 인산화는 GSK 활성성을 증가시킨다.³²⁾ Tong 등은³²⁾ 전처치 시 PI3-kinase에 의하여 GSK-3 β 가 억제됨으로 인하여 재관류 후 심장을 보호한다고 하였으며, Gross 등은¹⁷⁾ 지표 허혈 전에 투여한 morphine과 δ -아편유사물질 수용체 작용제인 BW373U86이 GSK- β 의 억제에 의하여 심장을 보호한다고 하였다. 또한 최근 Pagel 등은³³⁾ GSK- β 억제제 재관류 시기에 투여된 isoflurane의 심장보호 효과에 중요한 역할을 함을 보고하였다. 따라서 전처치, 후처치, 혹은 재관류 시의 약물 투여 등과 같은 모든 경우에서 GSK- β 의 억제는 허혈 및 재관류 손상을 감소시키는 중요한 요소가 된다. 본 연구에서는 후처치에 의한 GSK-3 β 의 억제가 후처치에 의한 아편유사물질 수용체 활성화와 관련이 있는가를 알아보려고 하였다. 그 결과 GSK-3 β 가 후처치에 의한 심근 보호 기능에 중요한 역할을 하며, 아편유사물질 수용체 활성화의 하향 매개인자가 되고 mPTP 개방 억제에 대한 상향 매개인자 역할을 함을 알 수 있었다.

한편 사립체가 재관류 후 심근 세포 생존에 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 칼슘, 산화성 스트레스, ATP 고갈 등과 같은 상황에서 사립체 내막 투과성의 급격한 변화가 발생되는데 mPTP의 개방은 세포 괴사 및 세포자멸사를 초래하며 이의 개방 억제는 재관류 후 심근을 보호하게 된다.³⁴⁾ mPTP는 허혈 기간 동안에는 닫혀 있다가 재관류 초기 수분 이내에 사립체로 칼슘이 유입되고 급격한 산화성 스트레스 그리고 허혈 시 생성된 유산이 제거되면서 mPTP가 개방된다.³⁵⁾ mPTP 개방은 사립체로의 용질 및 수분 이동을 야기하여 표면적이 적은 사립체 외벽을 파괴시키게 되어 외벽 및 내벽 사이에 존재하는 세포자멸사 유발 인자들을 세포질로 방출시키게 되어 세포자멸사 혹은 세포괴사가 발생된다. 한편 Argaud 등은¹⁴⁾ 토끼를 이용한 실험에서 후처치가 mPTP 개방을 억제한다고 보고하였으나 그 기전은 밝히지 못하였다. 본 연구 결과에 의하면 쥐를 이용한 심장 재관류 모델에서 후처치가 mPTP 개방을 억제하였으며, 이는 GSK-3 β 의 억제에 의하여 발생되었다. 따라서 GSK-3 β 억제제 후처치에 의한 심근 보호 작용에 중요한 매개인자가 되며, 이를 통해서 mPTP 개방이 억제되어 심근 보호 작

용을 한다고 생각된다.

본 연구는 다음과 같은 제한점을 가지고 있다. 첫째로, adenosine 수용체와 아편유사물질 수용체 사이에 ‘교차 작용(cross-talk)’이 발생할 수 있다는 점이다. Peart와 Gross는²⁴⁾ 본 실험과 같이 쥐를 이용한 생체 내 실험에서 A₁ adenosine 수용체와 δ-아편유사물질 수용체 사이에 ‘교차 작용’이 발생된다고 하였다. 비록 그들의 연구에서 각 수용체에 대한 작용제 및 길항제들이 지포 허혈 전에 투여되었지만 후처치 기전에 A₁ adenosine 수용체와도 관련이 있다는 연구 결과에 의하면¹¹⁾ 본 연구에 의한 후처치 시의 GSK-3β 억제가 δ-아편유사물질 수용체 활성화에 의한 직접적인 것인지 아니면 δ-아편유사물질 수용체와 ‘교차 작용’에 의한 adenosine 수용체 활성화에 의한 영향을 동시에 받은 것인지는 분명하지 않다. 둘째로, 비심근 세포에서 PI3-kinase, PKC, target of rapamycin (TOR), ERK 등과 같은 매개인들이 GSK-3β의 음성 상향 조절인자들로 작용하는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾ 또한 심근에서는 PI3-kinase, TOR, ERK, Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) 등이 GSK-3β 억제를 야기하는 상향 조절 인자로 알려져 있다.^{17,37,38)} 이러한 인자들로 인한 GSK-3β 인산화 즉, 비활성화는 최종 효과처인 mPTP의 개방을 억제시켜 재관류 손상에 대한 심근을 보호하는 효과를 가지게 된다. 그러나 본 연구에서 후처치가 아편유사물질 수용체를 활성화시켜 GSK-

3β 억제를 야기하였으나 어떠한 중간 매개 인자들이 주로 관련되는지에 대한 연구가 추가적으로 필요하다고 생각된다.

결론적으로 쥐를 이용한 허혈성 후처치가 δ-아편유사물질 수용체를 활성화시켜 GSK-3β를 억제하고 이것이 사립체의 mPTP 개방을 억제함으로써 재관류 후 심근 괴사를 감소시켰다(Fig. 6). 하지만 δ-아편유사물질 수용체 활성화가 어떠한 중간 매개 인자들을 통하여 GSK-3β를 억제하는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

본 연구를 위하여 기술적 도움을 주신 의료정보학교실 윤경일 교수님과 동물 실험실의 서삼교 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H 579-88.
- Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV: Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1103-10.
- Penna C, Cappello S, Mancardi D, Raimondo S, Rastaldo R, Gattullo D, et al: Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 168-79.
- Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J: Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 1006-10.
- Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al: Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺-overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H 1900-8.
- Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, et al: Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signaling. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 315-24.
- Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM: The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 69-75.
- Hausenloy DJ, Yellon DM: Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70:

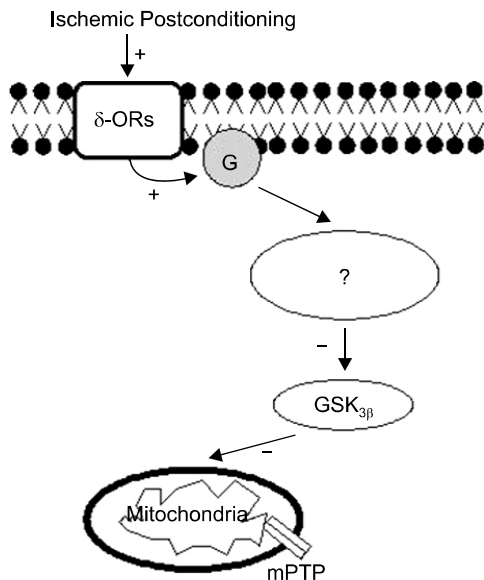


Fig. 6. Proposed signaling pathway leading to the cardioprotection of ischemic postconditioning. ORs: opioid receptors. Ischemic postconditioning confers cardioprotection by modulation of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) via δ-opioid receptor activation and glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) inhibition.

- 240-53.
10. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, et al: Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 124-33.
 11. Lu J, Zang WJ, Yu XJ, Jia B, Chorvatova A, Sun L: Effects of postconditioning of adenosine and acetylcholine on the ischemic isolated rat ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 133-9.
 12. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ: Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268: H 2157-61.
 13. Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D: Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 2004; 109: 1714-7.
 14. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M: Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111: 194-7.
 15. Bernardi P, Petronilli V: The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 1996; 28: 131-8.
 16. Park SS, Zhao H, Jang Y, Mueller RA, Xu Z: N6-(3-iodobenzyl) adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 124-31.
 17. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ: Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94: 960-6.
 18. Lochner A, Genade S, Moolman JA: Ischemic preconditioning: infarct size is a more reliable endpoint than functional recovery. *Basic Res Cardiol* 2003; 98: 337-46.
 19. Chang WL, Lee SS, Su MJ: Attenuation of post-ischemia reperfusion injury by thaliporphine and morphine in rat hearts. *J Biomed Sci* 2005; 12: 611-9.
 20. Zhang Y, Irwin MG, Wong TM: Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology* 2004; 101: 918-23.
 21. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, Bruce IC, et al: Kappa- opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology* 2006; 105: 550-6.
 22. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM: Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95: 230-2.
 23. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F: Postconditioning: a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 295-310.
 24. Peart JN, Gross GJ: Adenosine and opioid receptor-mediated cardioprotection in the rat: evidence for cross-talk between receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H 81-9.
 25. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ: Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (δ)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2187-95.
 26. Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, Calderera CM, Guarnieri C: Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim Biophys Acta* 1989; 987: 69-74.
 27. Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH: Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 1-10.
 28. Wong TM, Lee AY, Tai KK: Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart-an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 1167-75.
 29. Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM: Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H 384-91.
 30. Peart JN, Gross ER, Gross GJ: Effect of exogenous kappa-opioid receptor activation in rat model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 410-5.
 31. Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359: 1-16.
 32. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E: Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90: 377-9.
 33. Pagel PS, Krolikowski JG, Neff DA, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, et al: Inhibition of glycogen synthase kinase enhances isoflurane-induced protection against myocardial infarction during early reperfusion in vivo. *Anesth Analg* 2006; 102: 1348-54.
 34. Hausenloy DJ, Yellon DM: The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 339-41.
 35. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ: Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 29-46.
 36. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ: Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem* 1992; 267: 16878-82.
 37. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ: The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H 827-34.
 38. Gross ER, Gross GJ: Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 212-21.