

허혈성 자극에 의한 심방이노 호르몬 분비 반응의 특성

김 공 수* · 김 민 호* · 김 창 곤* · 김 석 기* · 조 경 우** · 최 훈**

=Abstract=

Characteristics of hypoxia-induced ANP Secretion in Perfused Beating Atria

Kong Soo Kim, M.D.*, Min Ho Kim, M.D.*, Chang Gon Kim, M.D.*, Suk Kee Kim, M.D.*
Kyung Woo Cho, M.D.**, Xun Cui, M.D.**

Background: Cardiac atrium is an endocrine gland secreting a family of natriuretic peptides. The secretion of atrial natriuretic peptide(ANP) has been shown to be controlled by variable factors. The change in atrial dynamics have been considered as one of the most prominent stimuli for the stimulation of ANP secretion. Hypoxic stress has been shown to increase cardiac ANP secretion. However, the mechanism by which hypoxia increases ANP secretion has not to be defined. Therefore, the purpose of the present study was two-fold: to develop a protocol to define the effect of hypoxia on ANP secretion in perfused beating rabbit atria and to clarify the mechanism responsible for the accentuation by hypoxia of ANP secretion. **Material and Method:** Experiments have been done in perfused beating rabbit atria. ANP was measured by radioimmunoassay. **Result:** Hypoxic stimulus with nitrogen decreased atrial stroke volume. The decrease in atrial stroke volume recovered basal level during the period of recovery with oxygen. ANP secretion and the concentration of perfusate ANP in terms of extracellular fluid(ECF) translocation which reflects the rate of myocytic release of ANP were increased by hypoxia and returned to basal levels during the recovery. Changes in ECF translocation paralleled to that of atrial stroke volume. At the start of recovery in atrial stroke volume, ECF translocation increased for several minutes. The above responses were stable and reproducible. Glibenclamide treatment prevented the recovery in atrial stroke volume. Increments by hypoxia of ANP secretion and ANP concentration were suppressed by glibenclamide. **Conclusion:** These results indicate that hypoxia increases atrial myocytic ANP release and that the mechanism responsible for the accentuation is partially related to the change in K⁺ATP channel activity.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:398-406)

Key word: 1. Heart atrium
2. Natriuretic peptide, atrial
3. Hypoxia
4. Radioimmunoassay

*전북대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chonbuk University Medical school

**전북대학교 의과대학 생리학 교실

Department of Physiology, Chonbuk University Medical school

† 이 연구는 1997년 한국학술진흥재단 연구비(1997-001-F00031)로 이루어 졌음

논문접수일 2000년 2월 7일 심사통과일 : 2000년 5월 22일

책임저자 : 김공수(561-712) 전북 전주시 덕진구 금암동 634-18, 전북대학교병원 흉부외과. (Tel) 0652-250-1486 (Fax) 0652-250-1480
본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다

서 론

심장의 심방은 심방이뇨 호르몬(atrial natriuretic peptide, ANP)을 합성하고 분비하며, 이 호르몬은 혈장에 적당한 농도로 유지되고 신장과 혈관 등 여러 기관에서 이 호르몬 특이적인 수용체를 통하여 그 기능을 나타내고 있어 심장은 내분비 기관으로 인식되었다¹⁾. 처음의 인식과는 다르게 심방뿐만 아니라 심실도 소량의 심방이뇨 호르몬을 분비하고 있음이 알려졌으며 더욱이 허혈성 심장질환이나 심장비대를 동반하는 병태 생리에서는 심방이뇨 호르몬의 심방으로부터 분비가 촉진됨이 관찰되었다²⁾. 심방이뇨 호르몬의 심방으로부터 분비는 여러조절 요인에 의하여 촉진됨이 알려져 있으나 가장 보편적인 요인은 심방의 기계적 용적 변동으로 간주되고 있다³⁻⁵⁾. 이와 관련하여 Ca^{2+} 에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 조절은 대단히 흥미로운 분야이다. 현재까지, Ca^{2+} 에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 조절은 분비를 촉진시킨다는 주장^{6,7)}과 Ca^{2+} 은 심방이뇨 호르몬 분비에 억제적인 요인이라는 주장^{8,9)}등이 있어 아직 확실한 이론이 없다. Cho 등¹⁰⁾은 심방이뇨 호르몬 분비가 심방의 용적 변동(atrial stroke volume)에 의존적으로 촉진되며 이러한 때에는 심방근 세포외액 이동량(extracellular fluid(ECF) translocation)의 증가가 동반되는 사실로부터 심방이뇨 호르몬 분비를 두 과정으로 설명하였다. 즉, 심방근 세포로부터 유리된 단계와 유리된 호르몬 분자의 심방근 세포외액과 함께 하는 심방강내로의 이동의 단계로 설명하였다(two-step sequential mechanism). 이 후자의 ECF 이동의 단계는 심방근수축에 의한 심방근 세포외액의 convection으로 설명하여^{10,11)} Ca^{2+} 의존적인 과정으로 제안하였다. 그러나 그들은 심방이뇨 호르몬의 첫 단계인 심방근 세포로부터 유리된 단계는 Ca^{2+} 에 의하여 억제적으로 조절 받는다고 주장하였다⁹⁾.

Baertschi 등¹²⁾은 Langendorff 심장모형에서 허혈성 자극이 심방이뇨 호르몬 분비를 촉진함을 발견하고, 이는 심방으로부터의 분비 증가가 주원인 일 것이라 주장하였다. 그러나, 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 증가의 기전은 심방뿐만 아니라 심실에서도 관찰되었으며¹³⁾, 다른 연구자들에 의하여 다시 확인되었다¹⁴⁻¹⁷⁾. 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비의 촉진은, 이 호르몬의 신호전달 조절에 의하여 심실근 세포내 cGMP 생성을 촉진하고 이로부터 세포내 Ca^{2+} 환경을 재조정 함으로써, 허혈성 자극에 의한 심장의 손상을 보호할 것이라는 가정이 제시되었다¹⁴⁾. 그러나, 허혈에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 촉진 기전은 아직 밝혀지지 않았다. Xu 등¹⁵⁾은 K+ATP 통로와 관련이 있을 것이라고 제안하였으나 아직 규명되지 않았다. Baertschi 등¹²⁾은 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 촉진을 처음 발견 한

후, 다른 연구¹⁵⁾에서 K+ATP 통로 차단제에 의한 심방이뇨 호르몬 분비의 촉진을 주장하고 있다.

저자들은 심방이뇨 호르몬 분비 조절에 관한 Cho 등^{10,11)}에 흥미를 갖고, 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 촉진의 기전이 심방 세포의 이온 통로 특성과 어떠한 관련이 있는지 규명하고자 하였으며, 또한 박동하는 관류 심방에서 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비반응의 연구에 적합한 실험과정과 실험모형을 제안하고 위의 허혈성 자극에 의한 심방이뇨 호르몬 분비 촉진의 기전을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

박동관류심방모형

실험동물은 1.8~2 kg의 New Zealand White 계 가토를 이용하였다¹¹⁾. 가토를 thiopental sodium(30 mg/kg)으로 마취한 후 출혈시켜 희생시키고 개흉하여 심장을 적출하였다.

심장을 36.5°C의 산소가 포함된 생리적 식염수에 옮기고 좌측 또는 우측 심방을 조심스럽게 분리하였다. PE (polyethylene)관 2개를 그 내부에 배설시켜 만든 외경 4 mm의 투명한 캐놀러를 심방내 2.5 mm 깊이까지 위치하도록 고정하였다. 투명한 캐놀러는 눈금을 세기며 내부에 전자기극을 위하여 백금선을 배설하였다. 관류액의 유출은 이 캐놀러를 통하여 하였다. 내부 PE관 중 하나는 영양액을 심방내로 주입하는데, 또 다른 하나는 심방내 압력을 측정하는데 사용하였다. 투명한 캐놀러가 고정된 심방은 36.5°C의 2중 organ chamber에 옮겨 고정하며 전기 자극기로 적정하게 자극하였다(duration 0.3~0.5 msec, voltage 역치의 2배, 20~30 V, 6.1 cmH₂O distension)(Fig. 1). Organ chamber내에는 관류액과 동일한 조성의 용액으로 채우며 organ chamber는 회전(axial rotation)이 가능하여 심방의 용적 크기를 변형할 수 있게 하였다. 산소는 organ chamber 내부의 실리콘 관(silicon tube)으로 공급하였다. 관류액은 박동성 펌프(peristaltic pump)로 계속 주입하며, 실리콘 관을 통하여 gas mixing chamber 내에서 산소를 공급하였다. 관류액은 HEPES완충액으로 조성(mM)은 다음과 같다. 즉 NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 10, bovine serum albumin(BSA) 1%, 그리고 HEPES 10(NaOH로 pH 7.4)이다. 관류액의 주입속도는 1.25 ml/min로 하였다. 관류박동심방은 ANP분비가 일정하게 되고 심낭강(pericardial space)에 첨가한 ³H-inulin(심방근세포외액의 이동량 측정을 위하여)의 세포외강(extracellular space, ECS) 내로의 평형 분포가 되도록¹¹⁾ 약 30분 동안 관류시키면서 기다렸다가 실험하였다. 심방으로부터의 관류액은 얼음물에 넣어 둔 실험관에 2분 간격으로 수집하였다. 5~10회 채집한 후 관류액과 산소의 공급을 차단하고 20~50분 동안 허

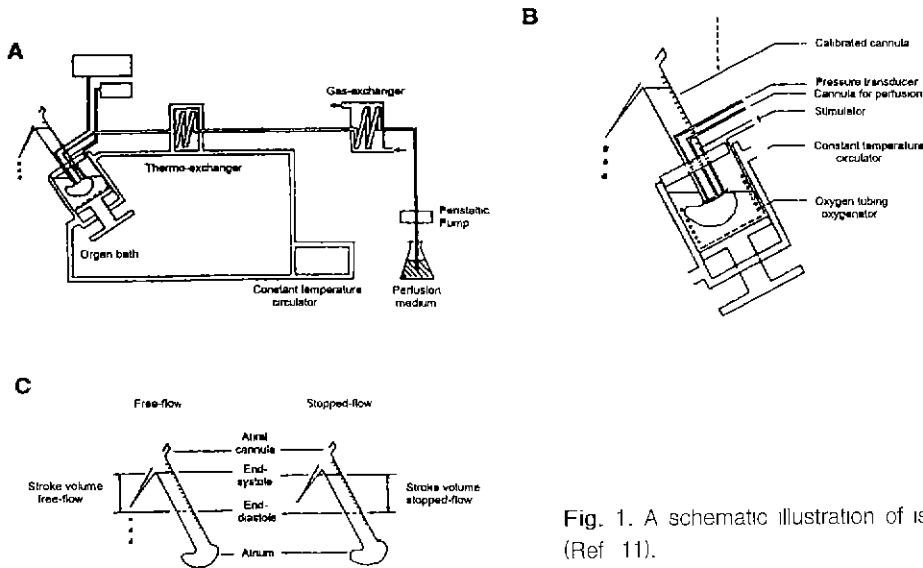


Fig. 1. A schematic illustration of isolated perfused beating rabbit atria (Ref 11).

혈상태를 유발시켰다. 이후 다시 산소의 관류액을 공급하고 관류액을 채집하였다. Glibenclamide는 관찰 20분 전에 투여를 시작하였다. 허혈상태의 유지 기간 동안 관류를 지속하는 경우에는 관류액의 용존 산소를 질소로 철저히 추출하였고 관류의 전 과정에서 산소의 노출을 최소한도로 줄여서 진행시켰다. 2분 동안에 분비된 ANP의 양은 그 농도와 관류액의 관류 속도를 곱하여 ng ANP/2min으로 계산하였다. 실험이 끝난 후 조직의 무게를 측정하며 관류액내의 ANP 농도는 실험 당일에 측정하였다.

저산소(Hypoxia)에 대한 관류심방의 반응성의 지표로서 심방 1회 수축량(atrial stroke volume, Vs) 또는 atrial work(Vs×심박수)와 ANP 분비량의 변동을 이용하였다. 또한 이 연구에서는 좌우심방 사이에 반응성에 차이가 있는지를 동시에 탐색하였다.

심방근 세포 외액 이동량의 측정

세포외액 이동량은 ³H-inulin을 표식자로 사용하며 청소율(clearance)을 측정함으로써 정량화 하였다¹¹⁾. 청소율은 다음의 공식에 의하여 산정 하였다.

$$\text{ECF translocation to atrial lumen (ul/2 min/g)} = \frac{\text{total radioactivity (cpm/2min/g)}}{\text{radioactivity of pericardial reservoir (cpm/ul)}} \times \text{tissue weight (mg)} \times 1000$$

심방이노호르몬 유리량 즉 심방이노호르몬 농도의 측정은 심방이노호르몬의 심방내 분비량을 그 때의 심방근 세포외액 이동량으로 나누어 산정하였다^{10,11)}.

심방이노호르몬 (ANP)의 방사면역측정법

심방이노호르몬 농도의 측정은 앞서 발표한 Cho 등¹¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

심방이노호르몬 항체의 제조는 atriopeptin III (APIII)를 항원으로 사용하며, carbodiimide 방법에 따라 atriopeptin III를 bovine thyroglobulin 과 conjugation시켜 동량의 Freund's adjuvant 와 잘 섞어 6주간 1주 1회씩 가토의 여러 부위에 주사하였다. 채혈은 2주 후부터 행하여 정량화 하며, 혈장은 5-6°C 30분동안 비활성화(inactivation)하여 사용하였다. Titer가 결정된 AP III의 항혈청은 사용에 편리하도록 소량으로 나누어 -70°C에 보관하였다.

125-I-AP III를 위한 iodination은 chloramine-T 방법에 의해 실시하였다. 즉 sodium phosphate buffer(pH 7.4, 0.5 M) 25ul가 들어있는 Eppendorf tube에 5ul의 APIII(Peninsula Laboratories) 5ug/5ul 와 sodium iodide-125(1 mCi/10 ul, Amersham) 10ul를 가하였다. Iodination하기 직전에 chloramine-T(1 mg/ml) 10ul를 가한 후 실온에서 40초간 조심스럽게 피펫(pipette)으로 혼합하고, sodium metabisulfite 대신 30% BSA 200ul를 넣어 반응을 정지시킨 후 Sephadex G-25 column에 조심스럽게 가하고 0.1 N acetic acid 로 0.5 ml/min의 속도로 용리(elution)하였다. 용리 완충액(Elution buffer)은 0.3% BSA, 0.3% lysozyme과 0.1% glycine 을 포함한 0.1 N acetic acid이며, 분할(fractionation)을 위한 tube에는 200 KIU/ml의 aprotinin이 함유된 용리 완충액(elution buffer) 3ml를 가해, 높은 방사성(radioactivity)에 의한 AP III의 파괴를 방지하였다. 약 1ml 씩 분할(fractionation) 한 직후 잘 혼합하여 25ul 속에 들어있는

방사성(radioactivity)를 측정하고, iodinated APIII 의 정점에 해당하는 분획(fraction)은 1,000,000 cpm/tube가 되도록 나누어 -70°C에 보관하였다. 사용하기 전 HPLC를 이용하여 재정제 하였다. Reverse phase HPLC는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 들어있는 20% acetonitrile 용액에서 60% acetonitrile (in 0.1% TFA)용액으로 40분동안 linear gradient 로 하며 속도는 1 ml/min로 하였다. 1분 간격으로 분획한 시료내의 방사성 (radioactivity)을 측정하여 심방이노호르몬의 peak 를 모아 Speed-vac evaporator로 건조하였고, 한 튜브당 10,000 cpm 이 되도록 하여 사용하였다.

심방이노호르몬의 방사면역측정(radioimmunoassay)은 0.2% neomycin, 10-3 M EDTA, 50 BAEE/ml SBTI 0.02% sodium azide 및 1% BSA 를 포함한 0.1 M Tris-acetate buffer(pH 7.4) 를 사용하였다. 관류액 내 ANP는 추출 과정을 거치지 않고 직접 측정하며 equilibrated radioimmunoassay에 의하였다. bound form 과 free form 의 분리는 charcoal suspension 을 사용하였다.

통계처리

허혈성 자극 전 후의 통계적 유의성은 one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test 로 검증 하였다. P < 0.05를 그 유의성의 한계로 하였으며, 결과의 표현은 means +SE 로 하였다.

결 과

(I) 허혈성 자극 실험이 가능한 박동관류 심방모형 : 허혈성 자극에 의한 ANP 유리의 특성

좌심방에 hypoxia를 일으킬 목적으로 관류액의 산소공급을 중단하였으나 심방 구출량(atrial stroke volume) 이나 ANP 분비 반응성에 큰 영향을 미치지 않았으며 이때 관류액 내 산소 분압의 현저한 감소를 관찰하지 못하였다. 이는 우리들이 사용하는 관류 심방 모형에서 심방을 담고 있는 organ chamber의 특성(Fig. 1) 때문으로 해석하여 다음 과정에서 산소 공급의 차단과 동시에 영양액 관류를 중지시켰다. 이 방법은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 저산소 기간 동안은 호르몬 측정을 위한 시료의 채취가 가능하지 않으므로 재 관류시작 첫 10분간의 변동과 그 직후 10분(recovery) 그리고 대조기간 동안의 변동을 상호 비교하였다. 영양액 재 관류가 시작되면 곧 이어 관류액 내 심방이노호르몬 분비의 현저한 증가를 보였다. 이 기간동안 심방구출량(atrial stroke volume)은 약간 감소하였으며 회복기간 동안 이 반응은 지속하였다. 우리는 이 연구에서 ANP 분비과정을 세포외액 이동 (ECF translocation) 의 특성과 관련지어 관찰하였다. 그 결과 재 관

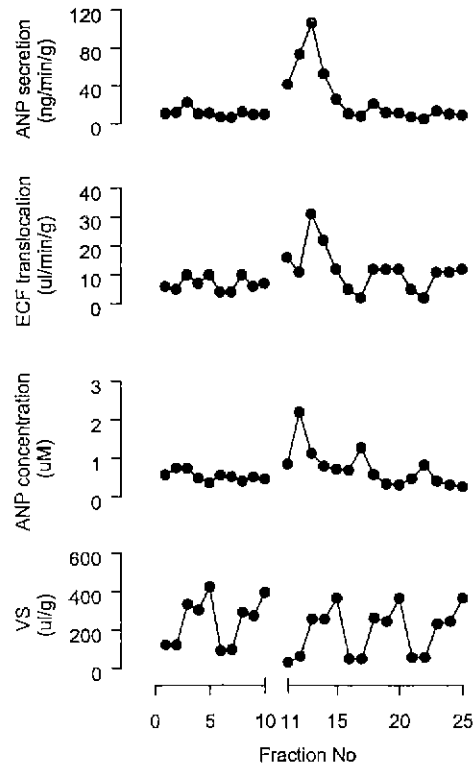


Fig. 2. Representative tracing for the effect of hypoxia on ANP secretion and atrial dynamics in beating left atria (0.8-2.0 Hz). Hypoxia was induced by omission of oxygen supply, during which atrial perfusion was stopped. Time lapsed for 30-50 min between fraction number 10 and 11. Each fractions are 2 min period.

류시작 직후의 심방이노호르몬 분비의 향상은 세포외액 이동의 증가를 동반하였다. 즉, 이 실험결과는 재 관류 직후 증가하는 심방이노호르몬은 심방 세포외액에 유리되어 축적된 (관류정지 기간동안) 심방이노호르몬의 씻겨나감(washout)에 기인할 것이라는 추측을 가능하게 하는 것이다. 우리는 이를 분석하고자 하여 분비된 심방이노호르몬 양을 그때의 세포외액 이동(ECF translocation) 양으로 보정 하였다. 즉 세포외액 이동(ECF translocation)으로 보정한 심방이노호르몬 분비량, 심방이노호르몬 농도는 재관류 시작 직후와 그 후 10여 분 동안 증가함이 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 심방근 세포로부터의 심방이노호르몬 유리는 저산소(hypoxia)에 의하여 증가함을 보이는 것이다(Figs 2, 3). 영양액 관류의 정지와 저산소는 재 관류시 심방수축력(atrial work)의 감소와 이때 심방이노호르몬 분비의 증가를 일으켰다(Fig. 3A, B). 재 관류 20분때 까지도 심방수축력은 회복되지 않았으나 심방이노호르몬 분비증가 반응은 대조기간 때의 수준으로 회복되었다(Fig. 3A). 심방이노호르몬 분비 증가는 세포외액 이동

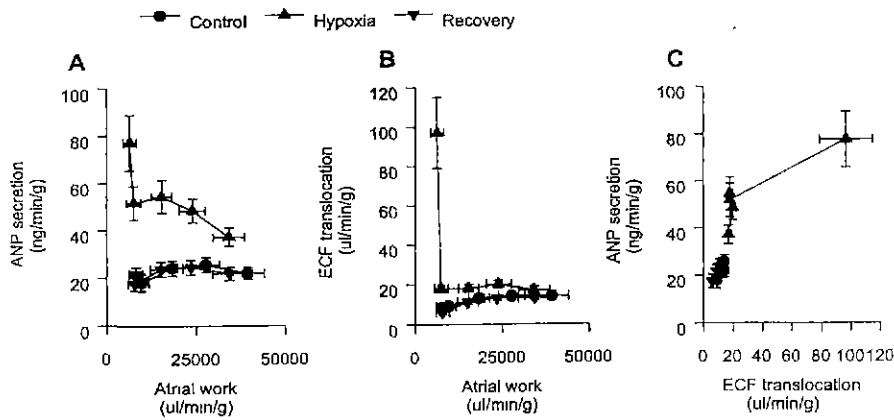


Fig. 3. Effect of hypoxia on ANP secretion and ECF translocation in terms of atrial work load in beating left atria. Hypoxia shifted the relationship between ANP secretion and ECF translocation upward. Hypoxia, first 10 min of reperfusion; recovery, next 10-20 min of reperfusion.

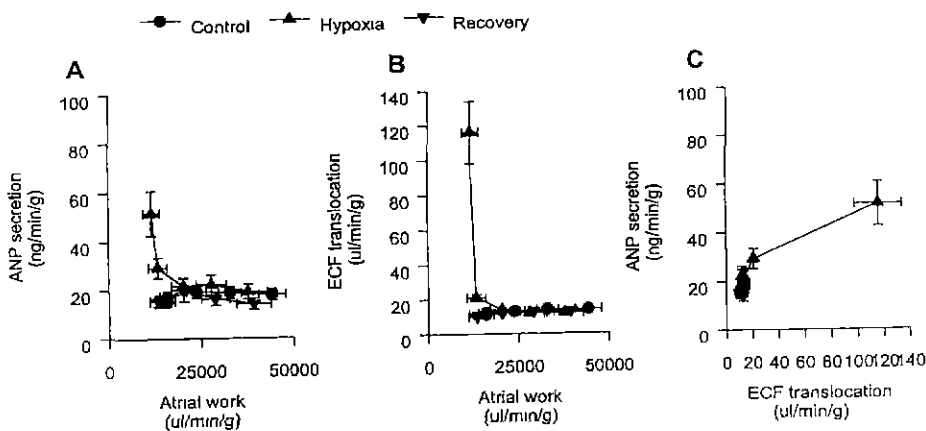


Fig. 4. Effect of hypoxia on ANP secretion and ECF translocation in beating right atria. Other legends are as in Fig. 3

의 증가를 동반하였다(Fig. 3B). Fig. 3C는, 심방이노호르몬 분비는 세포외액 이동에 의존적이며 허혈성 자극에 이러한 상관성이 심방 이동함을 보여주는 것이다. 이 실험과정에서 우리는 저산소 과정 중에 일어나는 심장호르몬 분비 특성 분석이 가능하지 않음을 해결하고자 하여 후술하는 바의 실험방법을 확립하였다.

허혈성 자극에 대한 심방의 반응에 좌우 심방 사이에 차이가 있는지 밝히고자 하였다. 영양액 관류의 정지에 의한 허혈성 자극에 대한 심방의 반응은 우심방에서도 유사하게 관찰되었다. 재관류 첫 10분과 다음 10분동안 atrial work는 감소되어 나타났으며(Fig. 4A, B) 심방이노호르몬 분비는 현저하게 증가 되었다(Fig. 4A). 심방이노호르몬 분비의 현저한 증가는 세포외액 이동의 증가를 동반하였다(Fig. 4B). 심방이노호르몬 분비는 세포외액 이동에 의존적이었으며 허혈성 자극은 그 상관관계를 심방 이동시켰다(Fig. 4C). 그러나, 우심방의 저산소 효과는 좌심방에 비하여 덜 현저 하였다.

우리는 앞서의 허혈성 자극 방법에서 ANP 분비반응이 대단히 신속하게 나타날 것이라 추측하였다. 따라서 영양액 관

류 정지 없이 허혈성 자극을 일으킬 수 있는 실험과정을 고안하였다. 즉 산소공급의 정지와 함께 관류액내 용존하여 있는 산소를 탈취 하고자 하여 미리 질소가스로 충전 하였으며, 심방을 담고 있는 organ chamber를 질소가스로 충전시키므로써 신속한 허혈성 자극을 가할 수 있었다. Fig. 5A는 이 방법에 의한 심방역동성의 변동을 보여주는 것이다. 심방 구출량(Atrial stroke volume)은 허혈성 자극 시작 2~4분 때에 감소하기 시작하였다. 저산소증에 의한 심방구출량의 감소는 반복적으로 나타났으며, 재산소화(reoxygenation) 2~3분 때에 회복 하기 시작 하였다. ANP 분비량은 심방구출량의 현저한 감소와 함께 변화를 보였으며 재산소화(reoxygenation) 직후 심방구출량의 회복과 함께 ANP 분비량의 현저한 증가를 일으켰다(Fig. 5B). ANP 분비는 심방의 용적변동(atrial stroke volume)에 의존적이므로 용적 변동량을 보정 하므로써 ANP 분비의 특성을 분석하였다. Fig. 5C는 허혈성 자극에 의한 결과 ANP 분비량의 감소에도 불구하고(Fig. 5B), 심방근 세포로부터의 유리의 양은 현저하게 증가함을 보여주는 것이다. 허혈성 자극에 의한 현저한 심방의 용적변동의 감소에도

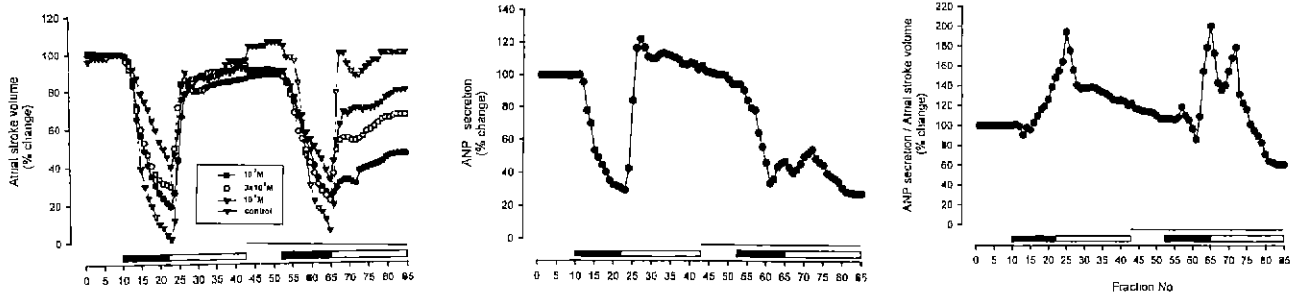


Fig. 5. A. Effect of K⁺ATP channel inhibitor, glibenclamide, on the hypoxia-induced changes in atrial stroke volume in beating atria. The values are expressed as per cent change to the values obtained at control periods. Hypoxia decreased atrial stroke volume reversibly. Glibenclamide aggravated hypoxia-induced inhibition of atrial stroke volume in a dose-dependent manner. Closed rectangular, hypoxia; open rectangular, reoxygenation; bar, glibenclamide infusion. Number of experiments, 3-6. B. Effect of hypoxia on ANP secretion. Hypoxia resulted in an apparent inhibition of ANP secretion followed by an increase during the reoxygenation. Pretreatment with glibenclamide (10⁻⁷ M) blocked the increase in ANP secretion observed during reoxygenation. C. Effect of hypoxia on the concentration of ANP in terms of ECF translocation which reflects the rate of atrial myocytic release of ANP into the interstitium.

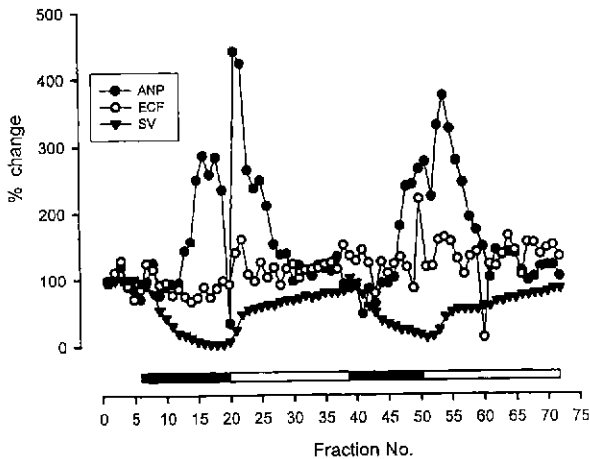


Fig. 6. Effect of hypoxia on ANP secretion, ECF translocation and atrial dynamics in beating atria. The response to hypoxic stress was reversible. The responses are expressed as per cent changes to the values obtained at control period.

불구하고 ANP 분비량의 현저한 증가를 일으켰다. 즉, 허혈성 자극기간 동안 뿐 만 아니라 재산소화 기간 동안에도 ANP 분비량은 증가 하였다. 이러한 반응은 반복적으로 재현 되어 나타났다(Fig. 6).

(II) 허혈성 자극에 대한 ANP 분비 증가 반응에서 K⁺ATP 통로의 역할은 무엇인가

Kim 등¹⁸⁾은 기계적 자극에 의한 심방 ANP 유리증가가 K⁺ATP 통로 차단에 의하여 억제됨을 관찰하였으며, 그 억제

기전에는 L-type Ca⁺⁺ channel을 통한 Ca⁺⁺ influx 의 증가가 관련된다고 주장 하였다. 허혈성 자극에 의한 ANP 분비 촉진의 과정에 K⁺ATP통로가 관련 되어 있는지 구명하고자 하여 glibenclamide에 의한 심방역동성(atrial dynamics)과 세포외액 이동량 및 ANP 분비 반응의 변동을 관측 하였다. Fig. 5A 는 허혈성 자극에 의한 심방의 용적변동의 감소와 여기에 미치는 glibenclamide(10⁻⁸, 3x10⁻⁸, 10⁻⁷M)의 영향을 관찰한 결과 이다. 허혈성 자극은 심방의 용적변동의 감소를 이르켰으나, 재산소화 직후 86~96%의 회복을 보였다. 즉 허혈성 자극은 14~4%의 기능적 손상을 일으켰다. 대조군에서는 허혈성 자극에 대한 반응이 반복적 이었다(96~94%). 그러나 glibenclamide 투여는 재산소화(reoxygenation)후 심방의 용적변동의 회복을 억제 하였다. 즉 glibenclamide 10⁻⁸M 은 평균 92%에서 89% 로; 3x10⁻⁸M 은 94%에서 73% 로; 10⁻⁷M 은 86%에서 52% 로 그 회복을 억제하였다. Glibenclamide 전처치는 심방의 용적변동의 재산소화후 회복율을 억제시키는 효과와 비슷하게 ANP 분비반응의 억제를 일으켰다(Fig. 5B). 즉 재산소화 후 현저한 증가를 보이던 ANP 분비는 glibenclamide (10⁻⁷M) 전처치에 의하여 억제 되었다. Fig. 5A에서 관찰된 바와 같이 glibenclamide 전처치는 재산소화에 의한 심방의 용적변동의 회복을 현저하게 억제(특히 10⁻⁷M의 glibenclamide 에서는 그 회복이 52%에 머물렀음) 하여 관류액 내 ANP 분비가 감소 되었을 수 있으므로(Fig. 5B), 심방 용적의 변동을 보정하여 ANP유리 특성을 분석하였다. Fig. 5C 에서 보는 바와 같이 glibenclamide 전처치 때에도 허혈및 재산소화에 의한 ANP유리 증가 반응은 지속되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 Fig. 7 에서 보는 바와 같다. 허혈은 ANP 분비와 ANP 농도의 현저한 증가를 이르켰다.

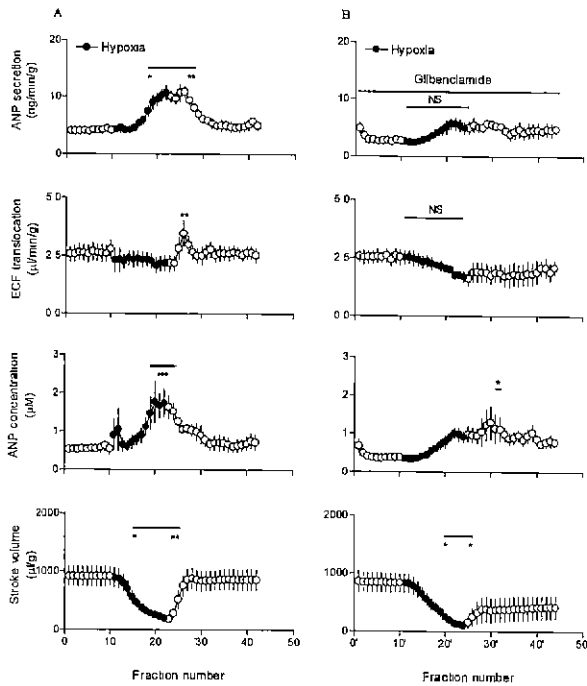


Fig. 7. Effect of glibenclamide(10⁻⁷ M) on the hypoxia-induced responses in ANP secretion, ECF translocation, ANP concentration and atrial dynamics in beating atria(n = 5). A, control experiments; B, 20 min prior treatment of glibenclamide

재산소화때 심방의 용적변동의 증가와 동반하여 관찰된 세포외액 이동량의 증가는 부분적으로 ANP 분비증가와 관련이 있었다. 이러한 사실은 ANP 분비량을 세포외액 이동량으로 보정한 ANP 농도의 변동에서 유추 되었다. Glibenclamide 전처치때에는 허혈에 의한 ANP 분비 증가의 감약에도 불구하고 ANP 농도의 지속적인 증가가 있었다. Glibenclamide 는 허혈에 의한 호르몬 유리 증가 반응을 감약 시켰으며, 심방 역동성의 변동을 강화 시켜 그 회복을 억제 하였다.

고 찰

1. 허혈성 자극이 가능한 박동관류 심방 모형

박동하는 심방에서 심방세포로부터 유래하는 물질의 혈장 내로 이동과정을 분석할 수 있는 실험방법과 분석이론이 Cho 등^{10,11)}에 의하여 제안되었다. 즉 심방근 세포에서 합성되어 혈장내로 분비되는 ANP 는 이단계 연속반응(two-step sequential mechanism)에 의하여 조절되는데 첫 단계는 심방근 세포가 ANP를 세포외액(extracellular space)으로 유리시키

는 단계와, 다음단계는 유리된 ANP 분자와 함께 세포외액(extracellular fluid)이 심방강내로 이동하는 과정이다. 그들은 첫단계 ANP 유리는 Ca²⁺에 의하여 억제된다고 주장하며, 두 번째 단계인 심방근 세포의 수축에 의한 세포외액(ECF)의 convective translocation은 궁극적으로는 Ca²⁺의존적이라고 주장한다. 따라서 이 이론에 의하면 ANP의 심방강 내로의 분비 조절에서 심방의 역동성(dynamics)과 세포외액의 이동 변동이 중요하게 관련된다. 우리는 이 이론에 의한 분석이 가능한 박동 관류 심방에서 저산소증에 의한 ANP분비 증가 반응을 심방의 역동성 변동과 함께 분석하였다. 관류 모형은 산소 공급의 정지와 질소 가스의 충전 그리고 관류 계통에 산소 접촉의 감소를 통하여 신속한 허혈이 가능하였다. 저산소증에 의한 심방 역동성의 변동과 호르몬 유리 그리고 세포외액 이동량의 변동은 반복적으로 관찰 되었다.

II. 박동 관류 심방에서 허혈성 자극에 의한 ANP유리의 특성

허혈성 자극에 의한 심방 구출량의 감소는 대단히 민감하여 자극 2~4분 때에 감소하기 시작하여 자극기간 동안 지속적으로 감소하여 재산소화후 2~3 분 때에 다시 회복하기 시작 하였다. ANP 분비조절 기전의 두 번째 단계인 유리된 ANP 의 세포 외액과의 이동의 단계(ECF translocation)는 심방 역동성의 변동과 유사하게 감소를 보였다. 그러나, 재산소화에 의한 역동성 회복의 시작 때에는 수 분 동안 지속하는 세포외액 이동량 증가의 현상이 관찰되었다. 겉보기 ANP 분비량과 심방근 세포의 ANP 유리량 변동을 나타내는 세포외액 이동량으로 보정한 ANP 농도는 저산소증에 의한 증가 후 재산소화때 회복하기 시작하여 원래의 수준으로 복귀 하였다. 저산소증에 의한 심방 역동성의 감소와 더불어 관찰된 ANP 분비와 심방근 세포 ANP 유리의 이러한 변동은 심방근 세포내 ATP 의 고갈과 관련이 있을 가능성이 높다. 저산소증에 의한 ANP 분비 증가의 세포내 기전은 아직 밝혀지지 않았다²⁾. Uusimaa 등¹⁹⁾은 그러한 조절 기전으로서 세포내 에너지 대사와의 관련성을 제시한바 있으며, 이 연구의 결과는 그러한 추정과 관련되어 해석 될 수 있을 것이다.

이 연구에서 보는바와 같이 ANP 분비 증가의 기전에는 심방근 세포로부터 유리의 증가가 내포되어 있는데, 이 증가는 허혈성 자극에 의한 심방 역동성의 감소에 의하여 나타나는 ANP 이동량의 감소 때문에 분석에 어려움이 있을 것이다. 동시에 재산소화에 의한 회복기에 관찰되는 세포외액 이동량 증가에 의한 겉보기 ANP 분비 증가는 세포외액에 추적된 ANP 의 씻겨나감(washout)에 의한 부분도 포함되어 있을 것이다. 이 문제는 세포외액 이동량을 정량적으로 분석하여 해결할 수 있었다.

III. 허혈성 자극에 의하여 촉진된 ANP 분비에 미치는 K⁺ATP
통로 차단제 의 영향.

박동 심방 관류 모형에서 허혈성 자극은 심방 역동성의 감소와 ANP 분비의 증가를 이르켰다. 허혈성 자극에 의한 K⁺ATP 통로의 활성화는 알려져 있고²⁰⁾, 허혈성 자극에 의한 ANP 분비 증가의 기전이 K⁺ATP 통로기능과 관련이 있으며¹⁵⁾, 또한 선행한 연구에서 K⁺ATP 통로는 ANP 분비 조절에 관련이 있음이 관찰되어¹⁸⁾, 허혈성 자극때 관찰 되는 ANP 분비 증가의 기전이 K⁺ATP 통로 활성화와 관련이 있을 가능성이 있다. 따라서, 우리들은 이 연구에서 K⁺ATP 통로 차단제인 glibenclamide를 사용하여 그 가정을 검증하였다.

Glibenclamide 전처치는 허혈성 자극후 재산소화때 회복되는 심방용적 변동양의 변동을 현저하게 억제하였다. 이때, 허혈성 자극에 의한 겔보기 ANP 분비와 ANP 농도의 증가 반응은 억제되었으나 소실 되지는 않았다. 이러한 사실은, 허혈성 자극에 의하여 항진된 ANP 유리 기전에는 K⁺ATP 통로 의존적인 부분과 그렇지 않은 부분이 존재 한다는 가능성을 제시 하는 것이다. 그러나, 만일 허혈성 심방에서 glibenclamide 에 대한 K⁺ATP 통로의 반응성에 변조가 와 있다면 상술한 바의 해석은 달라 질 수도 있을 것이다. 즉, K⁺ATP 통로 개구자(opener)의 사용 때와 허혈성 자극에 의한 K⁺ATP 통로의 개구 때 glibenclamide 의 효과가 다를 수도 있어²¹⁻²³⁾, ANP 분비에 대한 glibenclamide 의 억제 효과가 현저하지 않을 수 있다는 가정이다. 또 다른 하나는, glibenclamide 에 의한 부분적이 ANP 분비 억제가 K⁺ATP 통로 차단에 의한 탈분극과 이에 따른 심방근 세포내 Ca²⁺ 농도 증가에 의한 ANP 유리 억제로서 평행 하는 다른 기전에 의한 ANP 분비 감소 때문 일수도 있다는 점이다. 이 실험 모형에서 Ca²⁺ 은 ANP 유리를 억제함이 밝혀진 바 있다⁹⁾.

결 론

이 연구에서 우리는 앞으로의 연구에 유용하게 응용될 수 있는 허혈성 박동 관류 심방 모형을 완성하였다. 이 관류모형에서 허혈성 자극은 심방의 역동성 감소와 ANP 분비 반응의 항진을 일으켰고 이 자극과 반응은 반복적으로 재현되었다. 심방의 역동성이 제한 받는 허혈성 자극에 의한 심방호르몬 분비 특성 분석에는 심방세포외액의 이동특성 분석이 필수적이다. 허혈성 자극에 의한 ANP 유리 촉진의 기전에 K⁺ATP 통로의 관련성 만으로 모두 설명되지 않는 부분이 있으나 최소한 부분적으로는, K⁺ATP 통로의 개구가 관련되어 있음을 발견하였다.

참 고 문 헌

1. De Bold, AJ. *Atrial natriuretic factor: a hormone produced by heart.* Science 1985; 230:767-79
2. Ruskoaho, H. *Atrial natriuretic peptide . synthesis, release, and metabolism* Pharmacol Rev 1992; 44:481-602
3. Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger TH. *Atrial natriuretic factor-a circulating hormone stimulated by volume loading.* Nature 1985, 314:264-6.
4. Cho KW, Seul KH, Ryu H, Kim SH, Koh GY. *Characteristics of distension-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria.* Regul Peptides 1988; 22:333-45.
5. Cho KW, Seul KH, Ryu H, Kim SH, Koh GY. *Reduction volume dependence of immunoreactive atrial natriuretic peptide secretion in isolated perfused rabbit atria.* J Hypertension 1989, 7:371-5.
6. Ruskoaho H, Toth M, Lang RE. *Atrial natriuretic peptide secretin: synergistic effect of phorbol ester and A23187.* Biochem Biophys Res Commun 1985; 133:581-8
7. Schiebinger RJ. *Calcium, its role in isoproterenol-stimulated atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria.* Circ Res 1989; 65:600-6.
8. De Bold ML, De Bold AJ. *Effect of manipulation of Ca²⁺ environment on atrial natriuretic factor release.* Am J Physiol 1989; 256:H1588-94.
9. Cho KW, Kim SH, Seul KH, Hwang YH, Kook YJ. *Effect of extracellular calcium depletion on the two-step ANP secretion in perfused rabbit atria.* Regul Peptides 1994; 52:129-37.
10. Cho KW, Kim SH, Hwang YH, Seul KH. *Extracellular fluid translocation in perfused rabbit atria . implicanon in control of atrial natriuretic peptide secretion.* J Physiol 1993; 468:591-607.
11. Cho KW, Kim SH, Seul KH. *Mechanical basis of atrial natriuretic peptide secretion in beating atria : atrial stroke volume and ECF translocation.* Am J Physiol 1995; 268:R1129-36.
12. Baertschi AJ, Hausmaninger, C., Walsh R. S., Mentzer, R. M., JR., Wyatt, D. A, and Pence. R. A. *Hypoxia-induced release of atrial natriuretic factor(ANF) from the isolated rat and rabbit heart* Biochem Biophys. Res. Commun. 1986; 140:427-33
13. Uusimaa PA, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE, Vuoteenaho D, Ruskoaho H. *Ischemia stimulated the release of atrial natriuretic peptide from rat cardiac ventricular myocardium in vitro.* Life Sci 1991; 50:365-73.
14. Ljusegren ME, Andersson RGG. *Hypoxia induced release of atrial natriuretic peptide in rat atrial tissue : a role for this peptide during low oxygen stress.* Naunyn Schmied Arch Pharmacol 1994; 350:189-93.
15. Xu T, Jiao J H, Pence R A, Baertschi A J. *ATP-sensitive potassium channels regulate stimulated ANF secretin in*

- isolated rat heart*. Am J Physiol 1996; 271: H2339-45.
16. Arad M, Zamir N, Horowitz L, Oxman T, Rabinowitz B. Release of atrial natriuretic peptide in brief ischemia-reperfusion in isolated rat heart. Am J Physiol 1994; 266:H1971-8.
17. Lochner A, Genade S, Mouton R. Massive atrial natriuretic peptide(ANP) release in ischemia reperfusion. Cardiovasc Drug Ther 1992; 6:447-9.
18. Kim S H, Cho K W, Kim S Z, Chae S W. Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion: involvement of K^+ ATP channels and L-type Ca^{2+} channel modulation. Pflügers Arch-Eur J Physiol 1997; 434:362-72.
19. Uusimaa PA, Peuhkurinen KJ, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Hassinen IE. Role of myocardial redox and energy states in ischemia-stimulated release of atrial natriuretic peptide. J Mol Cell Cardiol 1992; 24:191-205.
20. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 1983; 305:147-8.
21. Findlay I. Sulphonylurea drugs no longer inhibit ATP-sensitive K^+ channels during metabolic stress in cardiac muscle. J Pharmacol Exp Ther 1993; 266:456-67.
22. Krause E, Englert H, Gogelein H. Adenosine triphosphate-dependent K currents activated by metabolic inhibition in rat ventricular myocytes differ from those elicited by the channel opener rilimakalim. Pflügers Arch 1995; 429:625-35
23. Russ U, Englert H, Scholkens BA, Gogelein H. Simultaneous recording of ATP-sensitive K^+ current and intracellular Ca^{2+} in anoxic rat ventricular myocytes. Effects of glibenclamide. Pflügers Arch 1996; 432:75-80.

=국문초록=

연구배경: 심방은 이노호르몬을 분비하는 내분비기관으로서의 역할이 있다. 심방이노호르몬의 분비는 여러 가지 요소들에 의해 조절된다. 심방의 혈액학적 변화는 심방이노호르몬 분비에 가장 큰 영향을 요소중의 하나로 알려져 왔다. 허혈성 자극 또한 심방이노호르몬의 분비를 증가시킨다고 알려져 왔다. 그러나 허혈성 자극에 의한 심방으로부터 심방이노호르몬의 유리 향진의 기전은 밝혀지지 않았다. 이 연구는 박동 가도 심방에서 허혈성 자극 모델을 만들고 허혈성 자극이 심방이노호르몬의 분비에 미치는 영향과 심방이노호르몬의 분비향진의 기전을 밝히고자 함이다. **대상 및 방법:** 실험은 가도에서 적출한 박동 관류 심방에서 시행되었다. 심방이노호르몬의 정량은 방사면역측정법을 이용하였다. **결과:** 질소공급에 의한 허혈성 자극은 심방 구출량(Atrial stroke volume)을 감소시켰다. 감소된 심방구출량은 산소공급을 재관류함에 따라 회복되었다. 허혈성 자극은 심방이노호르몬의 분비와 심방근 세포의 심방이노호르몬 유리를 증가 시켰다. 심방이노호르몬의 유리를 대비하는 세포외액량의 변화는 심방구출량의 증감과 비례함이 관찰되었다. 심방구출량이 회복되는 시점에서 세포외액량의 이동량이 수 분 동안 증가되었다. K^+ ATP 통로 차단제인 Glibenclamide 는 회복기때 심방구출량의 회복을 억제 하였으며 허혈성 자극에 의한 심방이노호르몬 분비의 증가를 감약하였다. **결론:** 이 실험에서 허혈성 자극에 의한 심방이노호르몬 유리 향진의 기전에는 그 자극에 의한 K^+ ATP 통로의 개구가 부분적으로 관여 할 것이라고 추측할 수 있었다.

- 중심단어.** 1. 심방
2. 심방이노호르몬
3. 허혈성 자극
4. 방사면역 측정법, 호르몬 분비